

Der neuronale GABA-Transporter 1: Identifizierung des Kanal-Modus und Regulation

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt im Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von
Stephan Michael Krause
aus Kriftel

Frankfurt am Main (2004)
(DF1)

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2001 bis August 2004 am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main unter der Betreuung von Prof. Dr. Wolfgang Schwarz angefertigt.

Vom Fachbereich 14 Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Dieter Steinhilber
Prof. Dr. Wolfgang Schwarz

Datum der Disputation:

Meinem Vater

I Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Die Nervenzelle	5
1.2	Die Synapse	6
1.3	Das Nervensystem	7
1.4	Der Maus-GABA-Transporter 1	8
1.4.1	Klassifizierung	8
1.4.2	Anatomische Einordnung	9
1.4.3	Klonierung	10
1.4.4	Struktur und Funktion	11
1.4.5	Die Stöchiometrie	14
1.4.6	Der Transportzyklus	15
1.4.7	Der Kanalmodus	17
1.4.8	Die Regulation	18
2	Material und Methoden.....	19
2.1	<i>Xenopus laevis</i>	19
2.2	Lösungen	20
2.3	RNA	21
2.3.1	RNA-Injektion	21
2.3.2	RNA-Präparation	21
2.4	Radioaktive Aufnahmemessungen	21
2.4.1	^3H -GABA-Aufnahme	21
2.4.2	$^{22}\text{Na}^+$ -Aufnahme	22
2.4.3	$^{36}\text{Cl}^-$ -Aufnahme	22
2.4.4	Spannungsabhängige ^3H -GABA-Aufnahme	22
2.5	Two-Electrode Voltage Clamp	23
2.6	Elektroden	25
2.6.1	Mikroelektroden	25
2.6.2	Badelektroden und Agarbrücke	26
2.6.3	Die Meßkammer	27
2.7	Auswertung der elektrophysiologischen Daten	27
2.8	Material	28
3	Der langsame transiente Strom	31
3.1	Einleitung	31
3.2	Resultate und Diskussion	32
4	Der Kanal-Modus	39
4.1	Einleitung	39
4.2	Resultate	42
4.2.1	Nipecotinsäure	42
4.2.2	Promethazin	47
4.2.3	SKF-89976-A	51
4.3	Diskussion	59
5	Phosphorylierung.....	67
5.1	Einleitung	67
5.2	Resultate	70

5.2.1	Inkubation mit 100 nM PMA.....	70
5.2.2	Inkubation mit 450 nM Calphostin C	73
5.2.3	Inkubation mit 10 μ M Forskolin und 100 μ M IBMX	76
5.2.4	Inkubation von 100 nM Okadaic acid.....	76
5.2.5	Injektion von Kinasen und Phosphatasen in Oozyten.....	76
5.2.6	Injektion von PKC	78
5.2.7	Injektion von PP2B	78
5.2.8	Koinjektion von PP2B und PKC.....	84
5.3	Diskussion.....	85
6	Regulation durch humane mRNA.....	90
6.1	Einleitung.....	90
6.2	Resultate.....	91
6.3	Diskussion.....	95
7	Zusammenfassung	98
8	Anhang.....	100
8.1	Darstellungen	100
8.1.1	Der Spannungspuls	100
8.1.2	Die Stromantwort.....	100
8.1.3	Der Steady-State-Strom	103
8.1.4	Der transiente Strom	105
8.1.5	Der kapazitive Strom	109
8.2	Formelsammlung	111
8.3	Literaturverzeichnis	116
8.4	Lebenslauf.....	123
8.5	Danksagung.....	124

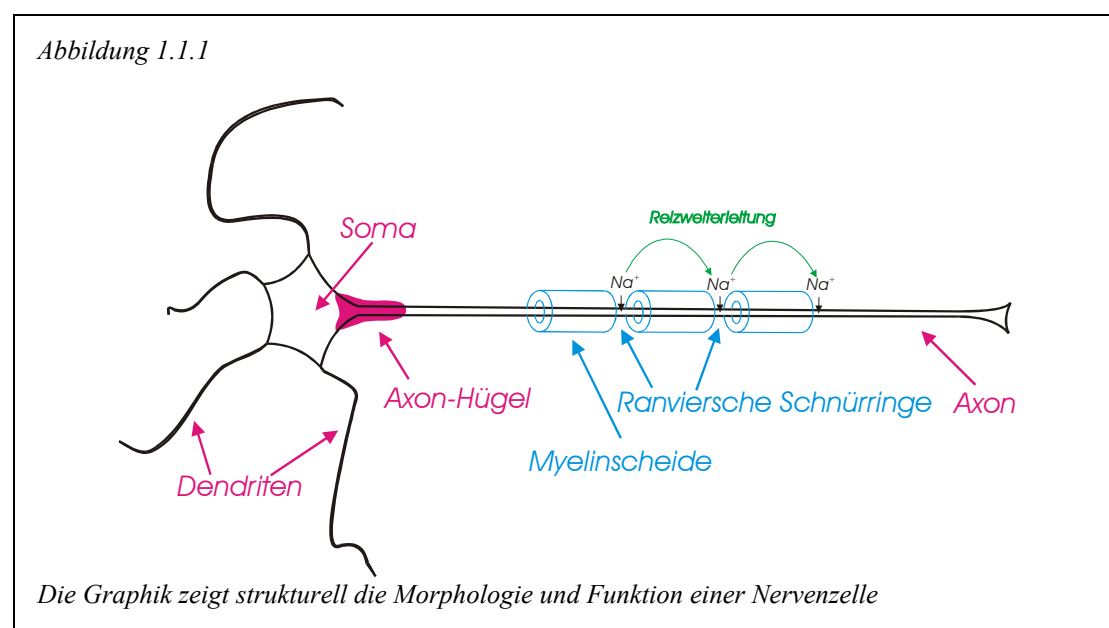
II Abkürzungen

DAT	Dopamin-Transporter
EL	Extrazellulärer Loop
GABA	γ -Aminobuttersäure
hGAT1	humaner GABA-Transporter 1
mGAT1	Maus-GABA-Transporter 1
rGAT1	Ratte-GABA-Transporter 1
GFP	green fluorescent protein
GLYT	Glycin-Transporter
IL	Intrazellulärer Loop
IV-Kurve	Strom-Spannungs-Abhängigkeit
K _m V-Kurve	Spannungs-Abhängigkeit der K _m -Werte
NS	Nervensystem
NT	Neurotransmitter
ORi	Oozyten-Ringer-Lösung
G-ORi	Gentamycin-haltige Oozyten-Ringer-Lösung
Ba-ORi	Barium-haltige Oozyten-Ringer-Lösung
NA	Nipecotinsäure
NET	Norepinephrin-Transporter
NTT	Neurotransmittertransporter
OA	okadaic acid
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMZ	Promethazin
PP2B	Phosphatase 2B
QV-Kurve	Ladungs-Spannungs-Abhängigkeit
RateV-Kurve	Rate-Spannungs-Abhängigkeit
SERT	Serotonin-Transporter
SKF	SKF-89976-A
τ V-Kurve	Zeitkonstante-Spannungs-Abhängigkeit
TMD	Transmembrandomäne
TEVC	Two-Electrode Voltage Clamp

1 Einleitung

1.1 Die Nervenzelle

Eine Nervenzelle besteht aus dem Zellsoma, einem oder zwei Axonen und je nach Nervtyp aus bis zu einigen tausend Dendriten. Das Axon kann im menschlichen Körper bis zu einem Meter lang sein. In der Regel werden Zellsoma oder Dendriten chemisch oder elektrisch gereizt. Der Reiz wird dann elektrisch durch die Nervenfasern zum Nervende geleitet. Am Axon findet sich eine hohe Dichte spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle. Bei Potentialen niedriger als -50 mV sind diese geschlossen. Wird die Nervenfasern an einem Ende durch einen chemischen oder elektrischen Reiz depolarisiert, und unterschreitet dadurch ihr Potential die Erregungsschwelle von ca. -50 mV , strömt an diesem Ende Na^+ durch spannungsabhängigen Na^+ -Kanäle ins Innere der Nervenzelle. Das Potential sinkt weiter. Dadurch wird die Na^+ -Leitfähigkeit immer größer bis das Potential schließlich $+40 \text{ mV}$ erreicht. Dies führt zur Depolarisierung in den benachbarten Regionen der Nervenfasern und somit zur Aktivierung der benachbarten spannungsabhängigen Na^+ -Kanäle. So kann in einem Axon ein Aktionspotential elektrisch weitergeleitet werden (Schwarz W. und Rettinger J., 2004). Um die Reizleitung zu beschleunigen, ist das Axon der Nervenzelle durch die Myelinscheide, unterbrochen von den Ranvierschen Schnürringen, isoliert. Dadurch springt das Aktionspotential des Nerven von Schnürring zu Schnürring (Abbildung 1.1.1).



1.2 Die Synapse

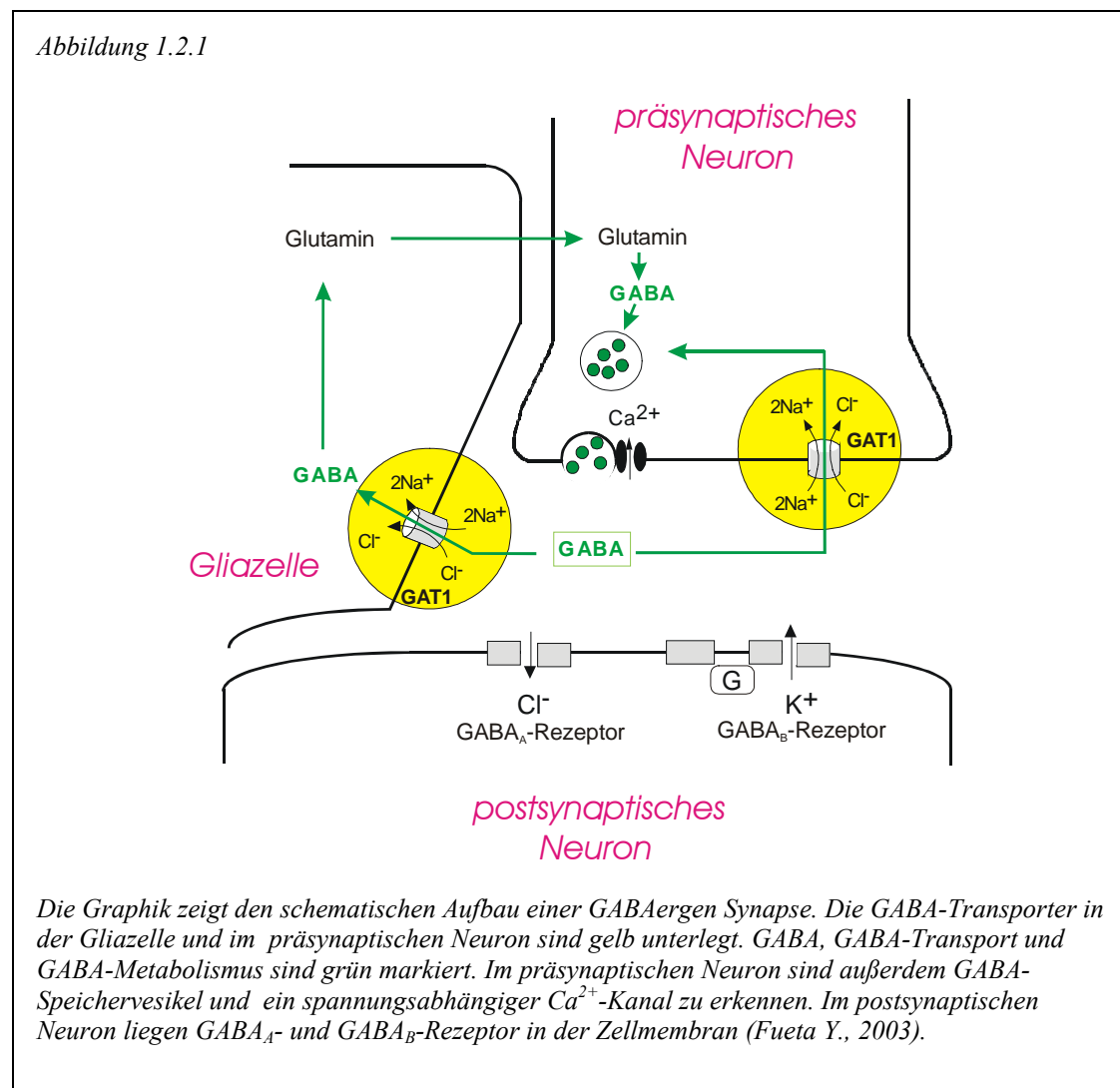
Eine Synapse ist die Verbindungsstelle zwischen zwei Nervenzellen. An der Synapse wird im allgemeinen der elektrische Impuls von der ersten Nervenzelle auf die zweite Nervenzelle übertragen. Dies geschieht entweder elektrisch oder chemisch. Man spricht von einer elektrischen Synapse (Weiterleitung eines Impulses mittels sogenannter „Gap-junctions“) oder einer chemischen Synapse (Übertragung durch einen chemischen Transmitterstoff).

Die chemische Synapse besteht aus einem Membranabschnitt am Axonende eines präsynaptischen Neurons, einem Membranabschnitt eines postsynaptischen Neurons und dem dazwischen liegenden synaptischen Spalt. In der präsynaptischen Axonendigung sind in Speichervesikeln die Neurotransmitter (NT) gespeichert. Die drei häufigsten Synapsentypen sind dabei axo-axonisch, axo-somatisch und axo-dendritisch (der präsynaptische Nerv ist definitionsgemäß zuerst genannt). Da die erregbarste Triggerregion einer Nervenzelle, der sogenannte Axon-Hügel, am Übergang vom Zellsoma zum Axon liegt, wird dort durch die axo-somatische Synapse ein Aktionspotential induziert. Die beiden anderen Synapsentypen werden häufig nur modulatorisch eingesetzt.

Erreicht ein Aktionspotential das Ende des präsynaptischen Axons, strömt Ca^{2+} durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle ins Zytosol. Die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration führt zur Exozytose der NT-Speichervesikel. Der NT diffundiert durch den synaptischen Spalt und erregt die postsynaptische Triggerregion durch Aktivierung der postsynaptischen NT-Rezeptoren. Beendet wird die Erregung der postsynaptischen Rezeptoren durch Abdiffusion des NT, durch Verstoffwechselung des NT und durch aktiven Rücktransport des NT mittels NT-Transportern. Wie der dramatische physiologische Effekt selektiver NT-Transporter-Inhibitoren zeigt, trägt dieser aktive Abtransport an den meisten Synapsen zum großen Teil zur Beendigung der synaptischen Reizweiterleitung bei (Masson et al., 1999).

Die chemischen Synapsen lassen sich sowohl funktionell als auch morphologisch unterteilen in exzitatorische Synapsen und inhibitorische Synapsen. Aktivierung der exzitatorischen Synapse führt zur Depolarisation des postsynaptischen Neurons; Aktivierung der inhibitorischen Synapse führt zur Hyperpolarisation des postsynaptischen Neurons. Der Abstand zwischen den beiden Neuronen der exzitatorischen Synapse beträgt ca. 30 nm, die erregbare Fläche des postsynaptischen

Neurons beträgt $1\text{--}2\ \mu\text{m}^2$ (Kandel et al., 1995); Impulse werden mit NT wie Glutamat und Aspartat (exzitatorische NT) weitergeleitet. Der Abstand zwischen den beiden Neuronen der inhibitorischen Synapse beträgt ca 20 nm, die erregbare Fläche des postsynaptischen Nerves ist kleiner als $1\ \mu\text{m}^2$ (Kandel et al., 1995); Impulse werden mit NT wie γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin (inhibitorische NT) weitergeleitet. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 1.2.1 Aufbau und Funktion einer GABAergen Synapse dargestellt.



1.3 Das Nervensystem

Das Nervensystem (NS) dient zur Aufnahme, Umwandlung, Verrechnung und Weiterleitung von Reizen sowie zur Koordinierung und Steuerung von

Körperfunktionen. In anatomischer Hinsicht läßt sich das NS unterteilen in das zentrale NS (ZNS) und das periphere NS. In funktioneller Hinsicht kann man das NS unterteilen in das autonome und das vegetative NS. Im ZNS, d. h. im Hirn und im Rückenmark, sind ausschließlich Neuronen untereinander verbunden. Im peripheren NS treten außerdem Nerv-Muskel-Verbindungen, Nerv-Drüse-Verbindungen und Nerv-Sinneszellen-Verbindungen auf.

Um an postsynaptischen Neuronen ein Aktionspotential aufzubauen, muß das Neuron durch ungefähr 75 exzitatorische Synapsen gereizt werden (Kandel et al., 1995). Liegen an einem Zellsoma inhibitorische und exzitatorische Synapsen an, überlagern sich deren Effekte zeitlich und räumlich am Soma. Zum Aufbau eines Aktionspotentials sind Abstand der Synapsen zum Axon-Hügel des postsynaptischen Nervs, Größe des Axon-Hügels selbst und die Übertragungsdauer der einzelnen Synapsen entscheidend. Die Übertragungsdauer der einzelnen Synapse wird unter anderem maßgeblich durch Dichte und Funktion der Neurotransmittertransporter bestimmt.

1.4 Der Maus-GABA-Transporter 1

1.4.1 Klassifizierung

Allgemein lassen sich die Neurotransmittertransporter (NTT) in vier Familien einteilen: (I) die vesikulären NTT, (II) die Na^+/K^+ -abhängigen NTT, (III) die Aminosäuretransporter und (IV) die Na^+/Cl^- -abhängigen NTT. Neben anderen Transportproteinen gehört der GABA-Transporter (GAT) zur Familie der Na^+/Cl^- -abhängigen NTT. Der GAT selbst kann in vier Subtypen, GAT1 – GAT4, unterteilt werden. Je nach Spezies unterscheidet sich die Nomenklatur. Zur Verdeutlichung siehe Tabelle 1.4.1 (Nelson N., 1998).

Tabelle 1.4.1
Nomenklatur der GABA-Transporter

	Maus	Ratte	Mensch
Subtyp 1	<i>mGAT1</i>	<i>rGAT1</i>	<i>hGAT1</i>
Subtyp 2	<i>mGAT2</i>	<i>rGAT4</i>	<i>BGT</i>
Subtyp 3	<i>mGAT3</i>	<i>rGAT2</i>	<i>hGAT2</i>
Subtyp 4	<i>mGAT4</i>	<i>rGAT3</i>	<i>hGAT3</i>

BGT = humaner Betain/GABA-Transporter

1.4.2 Anatomische Einordnung

Die vier Subtypen der Familie der Maus–GABA-Transporter zeigen zwischen 48% und 71 % Aminosäuresequenzhomologien. GABA ist für alle vier Transporter Substrat. Es können jedoch von den einzelnen Transportern auch andere körpereigene Substanzen transportiert werden, die teilweise eine höhere Affinität als GABA zeigen (Liu Q. et al., 1993). Tabelle 1.4.2 zeigt die Substratspezifität und Lokalisierung der einzelnen Transporter.

Tabelle 1.4.2
Substratspezifität und Lokalisierung der einzelnen Transporter

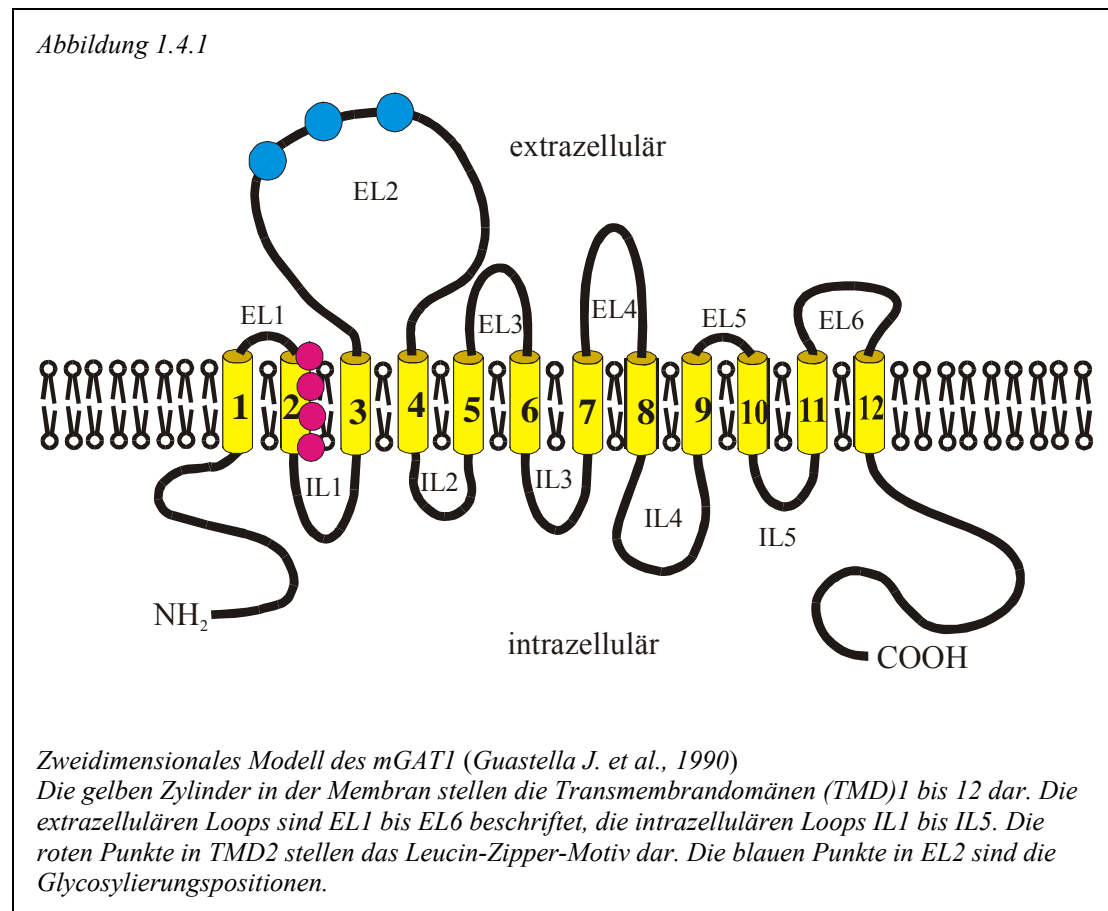
	Substrat	Lokalisierung
<i>mGAT1</i>	<i>GABA</i>	<i>ZNS</i>
<i>mGAT2</i>	<i>GABA</i> <i>Betain</i>	<i>ZNS</i> <i>Niere</i> <i>Leber</i>
<i>mGAT3</i>	<i>GABA</i> <i>β-Alanin</i> <i>Taurin</i>	<i>Niere</i> <i>Leber</i>
<i>mGAT4</i>	<i>GABA</i> <i>β-Alanin</i> <i>Taurin</i>	<i>Hirnstamm</i> <i>Cerebellum</i> <i>Cerebraler Cortex</i>

1.4.3 Klonierung

Kloniert wurde der GAT1 zuerst aus der Ratte (Guastella J. et al., 1990). Wenig später gelang die Klonierung auch aus Maus (Tam A. et al., 1994), Mensch (Nelson N. et al., 1990) und weiteren Spezies. Der rGAT1 ist mit dem mGAT1 in seiner Aminosäuresequenz identisch. Der humane GAT1 unterscheidet sich am N- und C-Terminus um insgesamt 17 Aminosäuren vom mGAT1; d. h., auch hier ist der Hauptteil in einer Länge von 473 Aminosäuren von Asp40 bis Phe512 identisch (Tam A. et al., 1994). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt, daß Untersuchungsergebnisse des rGAT1 bezüglich Funktion und Membrantargeting auf den mGAT1 übertragbar sind. Des weiteren kann man davon ausgehen, daß am mGAT1 gewonnene Untersuchungsergebnisse in begrenztem Rahmen auf den hGAT1 übertragbar sind.

Der mGAT1 besteht aus 599 Aminosäuren. Ohne Phosphorylierung oder Glycosylierung beträgt sein Molekulargewicht 67 kD. Glycosyliert beträgt sein Molekulargewicht ca. 80 kD (Radian R. et al., 1986). Sowohl N- als auch C-Terminus liegen intrazellulär. Das Ergebnis einer theoretischen Hydrophobizitätsanalyse schreibt dem mGAT1 12 Transmembrandomänen zu (Guastella J. et al., 1990) (Abbildung 1.4.1). Spätere experimentelle Untersuchungen (Bennett E. et al., 1997 ; Clark J., 1997 ; Yu N. et al., 1998 ; Mabeesh N. et al., 1992) konnten das theoretische Modell von Guastella et al. im wesentlichen bestätigen. Darüber hinaus beschreiben Bennett, Clark und Yu intramembranäre Loops, die allerdings nicht miteinander in Einklang zu bringen sind (Bennett E. et al., 1997 ; Clark J., 1997 ; Yu N. et al., 1998)

Intrazellulär weist der mGAT1 diverse Phosphorylierungsmöglichkeiten auf (siehe Kapitel 5). Im extrazellulären Loop 2 (EL2) finden sich an den Positionen 176, 181, und 184 drei glycosylierbare Asparagine (Bennett E. et al., 1997).



1.4.4 Struktur und Funktion

Seit seiner Klonierung wurde der GAT1 zu Untersuchungen der Struktur-Funktions-Beziehungen vielfach mutiert. Tabelle 1.4.3 zeigt sämtliche Mutationen, die am GAT1 durchgeführt wurden. Aus den in Tabelle 1.4.3 aufgeführten Arbeiten lässt sich folgendes Bild gewinnen: Die in der Familie der Na^+/Cl^- -abhängigen Transportproteine besonders hoch konservierte Aminosäure-Sequenz um TMD1 und TMD2 (Kilty J. et al., 1991 ; Pacholczyk T. et al., 1991 ; Blakely R. et al., 1991; Yamauchi A. et al., 1992) ist verantwortlich für die Na^+ - Bindung, die Na^+ -Leitfähigkeit und die Translokation der Substrate im Transportzyklus.

Im Falle des GAT1 scheinen EL4, EL5 und EL6 für die GABA-Bindung verantwortlich zu sein (Tamura S. et al., 1995), wobei Tryptophan 222 in TMD4 für die Erkennung der Aminogruppe essentiell ist (Kleinberger-Doron N. et al., 1994). Über die Struktur-Funktions-Beziehung der Cl^- -Bindung und Translokation liegen keine Daten vor. In TMD2 zeigt der mGAT1 ein Leucin-Zipper-Motiv. In der Tat

scheint der mGAT1 aufgrund dieses Motivs zu dimerisieren (Schmid J. et al., 2001 ; Scholze P. et al., 2002), wobei nicht klar ist, ob es sich um eine funktionelle Notwendigkeit oder um einen Effekt von Überexpressionssystemen handelt. N- und C- Terminus scheinen nicht maßgeblich am Transport beteiligt zu sein (Mabjeesh N. et al., 1992). Tertiär- und Quartärstruktur des mGAT1 sind nicht bekannt.

Tabelle 1.4.3

Bis August 2004 bekannte Mutationen des GAT1

Punktdeletion	<i>ΔP42</i>	(4)		<i>ΔT46</i>	(4)		<i>ΔR50</i>	(4)		<i>ΔA358</i>	(10)
	<i>ΔD43</i>	(4)		<i>ΔW47</i>	(4)		<i>ΔF51</i>	(4)		<i>ΔL408</i>	(10)
	<i>ΔR44</i>	(4)		<i>ΔK48</i>	(4)		<i>ΔV348</i>	(10)			
	<i>ΔD45</i>	(4)		<i>ΔG49</i>	(4)		<i>ΔR351</i>	(10)			

Punktmutationen	<i>R44S</i>	(4)		<i>C74S</i>	(9)		<i>Y241S</i>	(5)		<i>Q374C</i>	(23)
	<i>R44H</i>	(4)		<i>L83A</i>	(17),(1)		<i>Y248S</i>	(5)		<i>W381S</i>	(13)
	<i>R44K</i>	(4)		<i>Y86S</i>	(5)		<i>R257H</i>	(16)		<i>W381L</i>	(13)
	<i>D45S</i>	(4)		<i>Y86W</i>	(5)		<i>R257L</i>	(16)		<i>C399S</i>	(9)
	<i>D45L</i>	(4)		<i>Y86F</i>	(5)		<i>D287G</i>	(12)		<i>C399A</i>	(9)
	<i>D45A</i>	(7)		<i>L90A</i>	(17),(1)		<i>C288S</i>	(9)		<i>C399G</i>	(9)
	<i>T46A</i>	(7)		<i>L97A</i>	(17),(1)		<i>Y296S</i>	(5)		<i>L408G</i>	(10)
	<i>W47S</i>	(4)		<i>L97A</i>	(18)		<i>Y309S</i>	(5)		<i>Y412A</i>	(20)
	<i>W47V</i>	(4)		<i>E101G</i>	(12)		<i>Y309W</i>	(5)		<i>C428S</i>	(9)
	<i>W47F</i>	(4)		<i>E101B</i>	(12)		<i>Y309F</i>	(5)		<i>Y432S</i>	(5)
	<i>W47Y</i>	(4)		<i>E101Q</i>	(12)		<i>Y317A</i>	(20)		<i>F447P</i>	(8)
	<i>K48A</i>	(7)		<i>E101A</i>	(12)		<i>D319G</i>	(12)		<i>K448E</i>	(8)
	<i>D52A</i>	(7)		<i>C102S</i>	(9)		<i>C324S</i>	(9)		<i>Y452E</i>	(8)
	<i>D52G</i>	(12)		<i>L104A</i>	(17),(1)		<i>C325S</i>	(9)		<i>E467Q</i>	(16)
	<i>C57S</i>	(9)		<i>Y107A</i>	(20)		<i>C329S</i>	(9)		<i>E467K</i>	(16)
	<i>Y60E</i>	(11)		<i>W135S</i>	(13)		<i>I341C</i>	(23)		<i>C468S</i>	(9)
	<i>Y60T</i>	(11)		<i>W135L</i>	(13)		<i>G343C</i>	(23)		<i>W473S</i>	(13)
	<i>Y60C</i>	(11)		<i>Y139S</i>	(5)		<i>A346C</i>	(23)		<i>W473L</i>	(13)
	<i>G63D</i>	(11)		<i>Y139W</i>	(5)		<i>V348G</i>	(10)		<i>Y475S</i>	(5)
	<i>G63S</i>	(11)		<i>Y139F</i>	(5)		<i>V348L</i>	(10)		<i>Y475W</i>	(5)
	<i>G63C</i>	(11)		<i>Y140S</i>	(5)		<i>Ins-N349</i>	(10)		<i>Y475F</i>	(5)
	<i>W68S</i>	(21)		<i>Y140W</i>	(5)		<i>T349G</i>	(23)		<i>Y481A</i>	(20)
	<i>W68S</i>	(13)		<i>Y140S</i>	(5)		<i>T349H</i>	(15)		<i>W495S</i>	(13)
	<i>W68L</i>	(13)		<i>W222S</i>	(13)		<i>R351G</i>	(10)		<i>W495L</i>	(13)
	<i>W68F</i>	(13)		<i>W222L</i>	(13)		<i>A354C</i>	(23)		<i>W496S</i>	(13)
	<i>W68Y</i>	(13)		<i>W222F</i>	(13)		<i>A358G</i>	(10)		<i>W496L</i>	(13)
	<i>R69K</i>	(16)		<i>W222Y</i>	(13)		<i>A358C</i>	(23)		<i>K497E</i>	(16)
	<i>R69T</i>	(16)		<i>Y226S</i>	(5)		<i>S359C</i>	(23)		<i>K497Q</i>	(16)
	<i>R69M</i>	(16)		<i>Y226W</i>	(5)		<i>G362C</i>	(23)		<i>W500S</i>	(13)
	<i>R69H</i>	(16)		<i>Y226F</i>	(5)		<i>L363C</i>	(23)		<i>W500L</i>	(13)
	<i>R69G</i>	(16)		<i>W230S</i>	(13)		<i>A364C</i>	(23)		<i>W538S</i>	(13)
	<i>R69Q</i>	(16)		<i>W230L</i>	(13)		<i>F365C</i>	(23)		<i>W538L</i>	(13)
	<i>Y72S</i>	(5)		<i>W230F</i>	(13)		<i>L366C</i>	(23)		<i>C590S</i>	(9)
	<i>Y72W</i>	(5)		<i>W230Y</i>	(13)		<i>E370C</i>	(23)		<i>Y598A</i>	(20)
	<i>Y72F</i>	(5)		<i>K231Q</i>	(16)		<i>E370H</i>	(15)			
	<i>C74A</i>	(21)		<i>T236A</i>	(1)		<i>E374C</i>	(15)			

Deletion	$\Delta 3-49$	(2)	$\Delta 353-362$	(10)
	$\Delta 3-41$	(2)	$\Delta 348-351$	(10)
	$\Delta 528-599$	(2)	$\Delta 348-350$	(10)
	$\Delta 549-599$	(2)	$\Delta 348-349$	(10)
	$\Delta 561-599$	(2)	$\Delta 404-408$	(10)
	$\Delta 576-599$	(2)	$\Delta 4-30$	(1)
	$\Delta 348-369$	(10)		

Mutationen	<i>C493S, C499S</i>	(9)	<i>C74A, M55C</i>	(22)
	<i>T349H, E370H</i>	(15)	<i>C74A, S56C</i>	(22)
	<i>T349H, Q374C</i>	(15)	<i>C74A, V58C</i>	(22)
	<i>L97A, L104A</i>	(18)	<i>C74A, G59C</i>	(22)
	<i>L83A, L90A, L97A</i>	(18)	<i>C74A, Y60C</i>	(22)
	<i>L83A, L90A, L97A, L104A</i>	(18)	<i>C74A, A61C</i>	(22)
	<i>L73C, C74A</i>	(21)	<i>C74A, I62C</i>	(22)
	<i>G75C, C74A</i>	(21)	<i>C74A, G63C</i>	(22)
	<i>K76C, C74A</i>	(21)	<i>C74A, L64C</i>	(22)
	<i>N176D, N181G</i>	(14)	<i>C74A, G65C</i>	(22)
	<i>N176D, N181D</i>	(14)	<i>C74A, N66C</i>	(22)
	<i>N176D, N184D</i>	(14)	<i>C74A, V67C</i>	(22)
	<i>S24A, T46A, S562A</i>	(6)	<i>C74A, W68C</i>	(22)
	<i>D45A, D43A</i>	(7)	<i>C74A, R69C</i>	(22)
	<i>D45A, D43A, D40A</i>	(7)	<i>C74A, F70C</i>	(22)
	<i>D44A, L41A, G39A</i>	(7)	<i>C74A, P71C</i>	(22)
	<i>Y107A, Y317A, Y412A, Y481A, Y540A</i>	(20)	<i>C74A, Y72C</i>	(22)
	<i>C74A, F53C</i>	(22)	<i>diverse Consensus Sequenzen für Glycosylierung</i>	(3)
	<i>C74A, L54C</i>	(22)		

Chimären	<i>Austausch kompletter extrazellulärer Loops: L(III) von GAT3 L(IV) von GAT3 L(V) von GAT3 L(VI) von GAT3 L (IV) von GAT4 L (VI) von GAT2</i>	(19)
-----------------	--	------

Die Tabellen sind in Doppelspalten aufgeteilt; die erste Säule einer jeden Doppelspalte benennt die mutierte Aminosäure, die zweite Säule einer jeden Doppelspalte benennt die dazugehörige Veröffentlichung. Die Veröffentlichungen sind im folgenden aufgeführt.

1. Beckmann M. et al., 1998 b; 2. Bendahan A. et al., 1993; 3. Bennett E. et al., 1997; 4. Bennett E. et al., 2000; 5. Bismuth Y. et al., 1997; 6. Corey J. et al., 1994; 7. Deken S. et al., 2000; 8. Forlani G. et al., 2001; 9. Golovanevsky V. et al., 1999; 10. Kanner B. et al., 1994; 11. Kanner B., 2003; 12. Keshet G. et al., 1995; 13. Kleinberger-Doron N. et al., 1994; 14. Liu Y. et al., 1998; 15. MacAuley N. et al., 2001; 16. Pantanovitz S. et al., 1993; 17. Quick M. et al., 1997; 18. Scholze P. et al., 2002; 20. Tamura S. et al., 1995; 21. Whitworth T. et al., 2001; 22. Yu N. et al., 1998; 23. Zhou Y. et al., 2004; 24. Zomot E. et al., 2003

1.4.5 Die Stöchiometrie

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, daß der mGAT1 mit einem Molekül GABA als Zwitterion zwei oder drei Na^+ -Ionen und ein Cl^- -Ion über die Zellmembran transportiert (Radian R. et al., 1983 ; Kanner B., 1978 ; Radian R. et al., 1985 ; Keynan S. et al., 1988 ; Kavanaugh M. et al., 1992). Die Ermittlung dieses Verhältnisses beruht allerdings nur auf der Analyse der entsprechenden Hill-Koeffizienten sowie auf Abschätzungen entsprechender radioaktiver Aufnahmemessungen. Treibende Kraft für den Transport sind dabei das Membranpotential und der Na^+ -Gradient, der über die Zellmembran abfällt.

Nach (Radian R. et al., 1983 ; Kanner B., 1978 ; Radian R. et al., 1985 ; Keynan S. et al., 1988 ; Kavanaugh M. et al., 1992) ist die Anwesenheit von Cl^- für die Transporter-Aktivität unabdingbar. In anderen Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, daß auch in Abwesenheit von Cl^- (in Gegenwart von Na^+) ein, wenn auch reduzierter, GAT1-vermittelter GABA-Transport stattfindet (Mager S. et al., 1993 ; Bicho A., 2004).

Da nach den oben genannten Autoren pro Transportzyklus eine oder zwei Nettoladungen über die Membran transportiert werden, ist der GAT1 elektrogen. Das heißt, durch den Transport von GABA fließt ein Strom über die Zellmembran.

Anlaß zur Diskussion über die Stöchiometrie des GAT1 gibt der Vergleich zwischen GABA-Transport und Transport-vermitteltem Strom: Unter der Annahme, daß pro transportiertem Molekül GABA eine oder zwei Nettoladungen die Membran passieren, lassen sich aus den Ergebnissen radioaktiver ^3H -GABA-Aufnahmemessungen die dazugehörigen Membranströme berechnen. In der Tat zeigt sich, daß der berechnete Membranstrom bis zu einer Größenordnung niedriger ist als der gemessene (Eckstein-Ludwig U., 2000). Eine Ähnliche Diskrepanz ist zu finden, wenn man den Membranstrom aus Transportrate und Transporterzahl berechnet (Risso S. et al., 1996). Des weiteren gibt es die Beobachtung, daß der GAT1 in Gegenwart von GABA einen Cl^- -Austausch vermittelt (Loo D. et al., 2000).

Die unterschiedlichen Ergebnisse werden durch die unterschiedlichen Meßsysteme (radioaktive Aufnahmemessungen, Elektrophysiologie) und durch die unterschiedlichen Expressions- und Zellsysteme erklärt (Zellkultur, *Xenopus* Oozyten, rekonstituierte Membranvesikel). In diesen unterschiedlichen künstlichen Expressionssystemen kann die Funktion des GAT1 durch Faktoren wie

Phosphorylierung, Glycosylierung, Zytoskelett oder Expressionsgrad unterschiedlich beeinflusst werden.

1.4.6 Der Transportzyklus

Obwohl das Verhältnis von GABA zu den kotransportierten Ionen nicht gesichert ist, soll hier, um den Transportzyklus des GAT1 genauer zu beschreiben, zunächst eine feste Stöchiometrie von $1\text{GABA} : 2\text{Na}^+ : 1\text{Cl}^-$ angenommen werden; dieses Verhältnis wurde auch in allen Untersuchungen hinsichtlich des Transportzyklus als feste Stöchiometrie vorausgesetzt. Untersuchungen hinsichtlich des Transportzyklus des GAT1 wurden ausschließlich mit elektrophysiologischen Methoden durchgeführt. Dabei wurde die Elektrogenität des GAT1 und die hohe Zeitauflösung elektrophysiologischer Methoden ausgenutzt.

Im wesentlichen werden drei Stromsignale unterschieden: (I) der stationäre Einwärtsstrom (Kavanaugh M. et al., 1992), (II) der stationäre Auswärtsstrom (Lu C. et al., 1999a) und (III) der transiente Strom (Mager S. et al., 1993 ; Lu C. et al., 1995 ; Liu Y. et al., 1998 ; Bossi E. et al., 2002 ; Fesce R. et al., 2002).

Der stationäre Einwärts- und Auswärtsstrom ist zum Teil an den Einwärts- bzw. Auswärtstransport von GABA gekoppelt (Lu C. et al., 1999a). Der Auswärtsstrom ist nicht als Umkehrung des Einwärtsstroms zu betrachten; obwohl beide Ströme Na^+ - und Cl^- -abhängig sind, unterscheiden sich die $K_{1/2}$ -Werte für deren Aktivierung durch GABA deutlich (Hilgemann D. et al., 1999). Der $K_{1/2}$ -Wert für GABA für den Einwärtsstrom liegt bei gleicher Ionenverteilung beiderseits der Zellmembran im mikromolaren Bereich. Der $K_{1/2}$ -Wert für GABA für den Auswärtsstrom liegt unter denselben Bedingungen im millimolaren Bereich (Lu C. et al., 1999b).

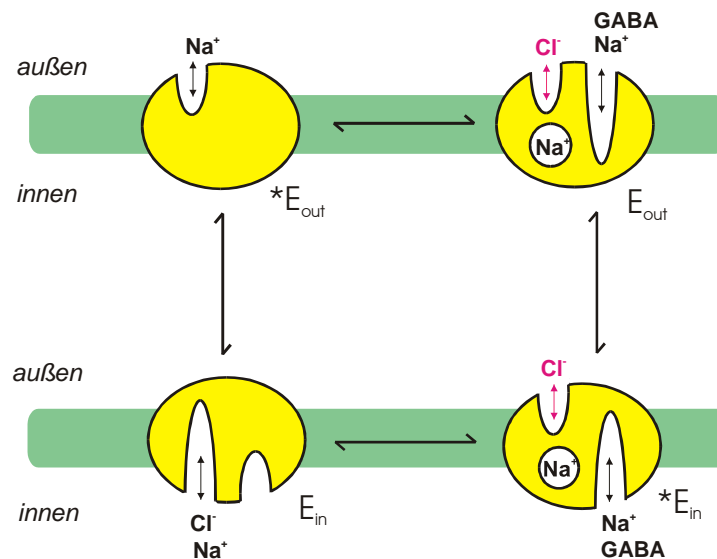
Der transiente Strom zeigt sich nur in Abwesenheit von GABA. Er läßt sich in eine schnelle Komponente (Lu C. et al., 1999a) und eine langsame Komponente (Mager S. et al., 1993) unterteilen. Die schnelle Komponente stellt eine Reorientierung des unbeladenen GAT1 dar, die langsame Komponente stellt eine Beladung des GAT1 mit Na^+ dar.

1999 fügte D. Hilgemann seine eigenen Resultate und die Resultate anderer Arbeitsgruppen zusammen und entwickelte einen Transportzyklus, der dem sogenannten „Alternating Access Model“ (Jauch, P. et al., 1986) folgt (Hilgemann D.

et al., 1999). In Abbildung 1.4.2 ist der Transportzyklus dargestellt und beschrieben. Folgende Eckpunkte des Transportzyklus sind festzuhalten: (I) Der Transportzyklus läuft nur in Gegenwart von Na^+ und Cl^- . GABA-vermittelte Ströme sogenannter Cl^- -freier Messungen lassen sich unter der Annahme, daß $1 \mu\text{M Cl}^-$ als Kontamination vorliegt, mit diesem Transportzyklus simulieren. Mögliche Cl^- -Kontaminationen können aus unreinen Salzen, Glasgefäßen, aus dem Zellinnern und aus pH-Elektroden stammen. (II) Der schnelle transiente Strom stellt die Reorientierung des Transporters von E_{in} nach $*E_{\text{out}}$ und die damit verbundenen endogenen Ladungsverschiebungen dar. (III) Der langsame transiente Strom stellt einen Schritt dar, der an die Na^+ -Bindung des Transporters gekoppelt ist; er ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Transportzyklus. (IV) Der Schritt des GABA-Einwärtstransports von E_{out} nach $*E_{\text{in}}$ ist Na^+ -abhängig, aber nicht Cl^- -abhängig. (V) Der Schritt des GABA-Auswärtstransports von $*E_{\text{in}}$ nach E_{out} ist Na^+ - und Cl^- -abhängig. (VI) Intrazelluläres Cl^- kann an E_{in} binden und eine Reorientierung verhindern.

Soweit läßt sich ein großer Teil der beobachtbaren Effekte mit diesem Transportzyklus beschreiben. Die Eigenschaften des langsamen transienten Stroms lassen sich mit diesem Modell nicht ausreichend erklären, widersprechen ihm aber auch nicht. Es bedürfte einer genaueren Klärung der Bindungssequenz von Na^+ und Cl^- bevor GABA an den GAT1 bindet.

Abbildung 1.4.2



Transportzyklus nach Hilgemann (Hilgemann D. et al., 1999)

Der GAT1 (gelb) liegt in der Membran (grün). Innen- und Außenseiten der Membran sind markiert. Alle Zustände liegen miteinander im Gleichgewicht. Instabile Zustände sind als $*E_{in}$ oder $*E_{out}$ gekennzeichnet, stabile Zustände sind als E_{in} oder E_{out} gekennzeichnet.

Na^+ kann an $*E_{out}$ binden. Die Okklusion von Na^+ überführt $*E_{out}$ in E_{out} . Um E_{out} in $*E_{in}$ zu überführen, müssen ein weiteres Na^+ und ein GABA binden; Cl^- (rot) kann binden, ist für die Translokation aber nicht notwendig. Um $*E_{in}$ in E_{in} zu überführen, muß das okkludierte Na^+ ins Zytoplasma dissoziieren und zeitgleich Cl^- (schwarz) von außen nach innen transportiert werden.

Nur der unbesetzte GAT1 kann sich nun von E_{in} in $*E_{out}$ reorientieren. Das heißt, eine Chloridbindung auf der zytoplasmatischen Seite führt zur Inhibition des Transportzyklus.

Der langsame transiente Strom stellt den Übergang von $*E_{out}$ in E_{out} dar. Der Transportzyklus im Uhrzeigersinn repräsentiert den Einwärtsstrom. Der Transportzyklus gegen den Uhrzeigersinn repräsentiert den Auswärtsstrom. Dabei ist wichtig zu beachten, daß ein Auswärtstransport nur stattfinden kann, wenn zeitgleich Cl^- von innen nach außen transportiert wird.

1.4.7 Der Kanalmodus

Neben dem Transportmodus für den Transport des NT GABA werden dem GAT1 zwei Kanalmodi zugeschrieben. Beiden Modi ist gemeinsam, daß sie eine Leitfähigkeit über die Membran herstellen, ohne dabei GABA zu transportieren. Der eine Modus entwickelt sich in Gegenwart von GABA (Risso S. et al., 1996 ; Eckstein-Ludwig U., 2000), der andere in Abwesenheit von GABA (Cammack N. et al., 1994 ; Cammack N. et al., 1996). In Abwesenheit von GABA konnten Cammack et al. an HEK-Zellen Einzelkanalereignisse messen, die sie dem GAT1 zuschrieben. An

Oozyten waren keine Einzelkanalereignisse zu messen (Eckstein-Ludwig, Rettinger, unveröffentlicht)

1.4.8 Die Regulation

Im Prinzip gibt es zwei wesentliche zelluläre Regulationsmechanismen. Das sind die Expressionsregulation und die Funktionsregulation. Die Expression kann in den einzelnen Schritten, Transkription, Translation und Membrantargeting reguliert werden. In dem in dieser Arbeit verwendeten Modellsystem *Xenopus* Oocyte spielt die Regulation durch Transkription keine Rolle, da zur Proteinexpression cRNA in die Zelle injiziert wird. Die Funktion des GAT1 kann durch die Zelle selbst oder von außen reguliert werden. Zu den bekanntesten zelleigenen Regulationsmechanismen gehören Phosphorylierung, Glykosylierung und Protein-Protein-Wechselwirkungen. Eine Beeinflussung dieser zelleigenen Regulationsmechanismen von außen ermöglicht eine indirekte Funktionsregulation des GAT1. Direkt kann der GAT1 reguliert werden, indem er mit GAT1 aktiven Substanzen interagiert.

2 Material und Methoden

2.1 *Xenopus laevis*

Die ausschließlich weiblichen Krallenfrösche (*Xenopus laevis*) stammen aus speziellen Züchtereien aus Südafrika und der Slowakei. Gehalten werden sie zu je 20 Tieren in undurchsichtigen 200 l Plastikcontainern mit kontinuierlicher Frischwasserzufuhr von wenigen Litern pro Tag. Das zugeführte Frischwasser ist vor Zugabe in die Froschbecken für ca. einen Tag abgestanden. Die Temperatur des Wassers beträgt 19 Grad Celsius, ein Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h wird durch einen künstlichen Hell-Dunkel-Rhythmus simuliert. Gefüttert werden die Tiere zweimal pro Woche mit klein gewürfeltem Rinderherz unter Zugabe von Vitaminen (Multisanostol®).

Die Entnahme der Oozyten erfolgte am vollständig analgesierten und relaxierten Frosch (Zur Analgesie und Relaxation: ca. 10 min Inkubationszeit in 2g/l Tricain enthaltender wässriger Lösung). Nach Entnahme aus der Tricain-Lösung wurde der Frosch mit Wasser gewaschen. Der Schluckreflex wurde durch leichtes Berühren der Kehle getestet. Blieb dieser aus, wurde dem auf dem Rücken liegenden Frosch mit einem ca. 1 cm langen Schnitt in der Leistenregion die Bauchdecke geöffnet. Teile des Ovargewebes wurden mit Schere und Pinzette entnommen. Das Ovargewebe konnte in G-ORi (siehe Tabelle 2.2.1) aufbewahrt werden. Nach der Operation wurde der Schnitt in der Bauchdecke des Frosches mit Nähseide mit ein oder zwei Stichen geschlossen. Nach einer Aufwachzeit von ca. 30 min unter einem feuchten Tuch wurde der Frosch für ein bis zwei Tage in einem Isolationsbecken mit einer Seesalzkonzentration von 0,5g/l aufbewahrt. Danach wurde ihm eine Regenerationsphase von mindestens 3 Monaten in einem 200 l Plastikcontainer gewährt. Diese Laparatomie ist beim Regierungspräsidium Darmstadt angezeigt und wird unter dem Aktenzeichen F105 Anz 03 geführt.

Je nach Menge des entnommenen Ovargewebes kann ein Frosch ca. 4 Jahre lang als Oozytenspender dienen. Nach dieser Zeit wird er entweder mit Tricain getötet oder an das Physiologiepraktikum für Medizin-Studenten der Universität Frankfurt weitergegeben, wo er auch sein Ende findet.

Die Oozytenseparation aus dem entnommenen Gewebe erfolgte unter Verwendung der Enzyme Liberase und Collagenase. Zur Verwendung siehe Tabelle 2.1.1.

Tabelle 2.1.1

Verwendete Enzymkonzentration zur Oozytenseparation

Enzym	Konzentration in G-ORi	Inkubationszeit bei 19°C	Schüttler
Collagenase	15mg / 10ml	3 – 4 h	60 rpm
	30mg / 10ml	12 h	-
Liberase	0,75mg / 10ml	3 – 4 h	60 rpm
	1,5mg / 10ml	12 h	-

Nach der beschriebenen Inkubationszeit wurden die separierten Oozyten mehrmals mit ORi gewaschen und die für Experimente brauchbaren Oozyten selektiert. Für Experimente brauchbare Oozyten müssen (I) vollständig befreit von kollagenem Bindegewebe und Follikelzellen sein, (II) sich im Reifestadium V und VI befinden, (III) gleiche Größe haben, (IV) kugelförmig sein, (V) eine gleichmäßig pigmentierte Oberfläche aufweisen und (VI) eine deutliche Trennung in animale und vegetative Hemisphäre zeigen

2.2 Lösungen

Waschen der Oozyten und des Ovargewebes wurde mit Oozyten-Ringer-Lösung (ORi) durchgeführt. Aufbewahrt und Inkubiert wurden Oozyten und Ovargewebe in Gentamycin-haltigem ORi (G-ORi). Zu elektrophysiologischen und radioaktiven Aufnahmemessungen wurde Ba-ORi verwendet. Tabelle 2.2.1 zeigt eine Zusammenfassung aller verwendeten Lösungen. Wurden zur Durchführung eines Experimentes weiter Substanzen (wie z. B. GABA) hinzugefügt, ist dies in der Darstellung des jeweiligen Experiments vermerkt.

Tabelle 2.2.1

	<i>Gentamycin</i> [mg/l]	<i>NaCl</i> [mM]	<i>CaCl2</i> [mM]	<i>BaCl2</i> [mM]	<i>KCl</i> [mM]	<i>MOPS</i> [mM]	<i>pH</i>
ORi	/	90	2	/	2	5	7,4
G-ORi	70	90	2	/	2	5	7,4
Ba-ORi	/	90	/	2	2	5	7,4

pH-Werte wurden mit NaOH-Lösung eingestellt. G-Ori wurde vor Zugabe von Gentamycin autoklaviert. Zur Änderung der Na⁺-Ionen-Konzentration wurde Na⁺-Gluconat verwendet, zur Änderung der Cl⁻-Ionen-Konzentration wurde TMA-Cl⁻ verwendet.

2.3 RNA

2.3.1 RNA-Injektion

Um zytosolische Proteine oder Membranproteine in Oozyten zu exprimieren, kann synthetische cRNA des entsprechenden Proteins in das Zytosol der Oocyte injiziert werden (Gurdon J. et al., 1971 ; Stühmer W. , 1998). Injiziert wird die in Wasser gelöste cRNA mit einer Nanoliter-Pumpe der Firma Drummond (USA).

2.3.2 RNA-Präparation

Zur Herstellung der synthetischen cRNA wurde der neuronale mGAT1 in den Oozyten-Transkriptions-Vektor pNWP kloniert, der eine Ribonucleosomen Bindungsstelle und einen Poly-A-Schwanz enthält. Das Plasmid wurde mit EcoRI linearisiert und unter Verwendung einer SP6-Polymerase und eines RNA-Synthese-Kits und Capping-Kits (Ambion Inc.) transkribiert (Liu Y. et al., 1998).

2.4 Radioaktive Aufnahmemessungen

2.4.1 ³H-GABA-Aufnahme

Je 10 Oozyten wurden zusammen in 200 µl Versuchslösung für 10 min inkubiert. 200 µl Versuchslösung setzten sich wie folgt zusammen: 175 µl Ba-ORi, 2 µl GABA-

Stammlösung (40 mM in H₂O), 20 µl Sucroslösung (10 mM in H₂O), 2 µl ¹⁴C-Sucrose-Stammlösung (16 kBq) und 1 µl ³H-GABA-Stammlösung (9,25 kBq). Die pro Zeiteinheit aufgenommene Menge an ³H ist ein Maß für die Transportaktivität des mGAT1, die gleichzeitig aufgenommene Menge an ¹⁴C ist ein Maß für die unspezifische Durchlässigkeit der Zellmembran der einzelnen Oozyte (Schmalzing G. et al., 1991). Während der ersten 10 min der GABA-Aufnahme in die Oozyte zeigt sich eine lineare Zunahme (Eckstein-Ludwig U., 1998). Nach 10 min Aufnahmezeit wurden die Oozyten mit Ba-ORi viermal gewaschen und dann einzeln in je 100 µl 5%iger SDS-Lösung aufgelöst. Nach Zugabe von 2 ml Szintillationslösung wurde die Radioaktivität der einzelnen Proben im Flüssigkeitszintillationszähler (Packard Instrument Company, Meriden, USA) für 5 min gemessen.

2.4.2 ²²Na⁺-Aufnahme

Je 10 Oozyten wurden zusammen in 200 µl Versuchslösung für 10 min inkubiert. 200 µl Versuchslösung setzten sich wie folgt zusammen: 197 µl Ba-ORi, 2 µl GABA-Stammlösung (40 mM in H₂O) und 1 µl ²²Na⁺ Stammlösung (74 kBq). Das weitere Prozedere entsprach der ³H-GABA-Aufnahme (siehe oben).

2.4.3 ³⁶Cl⁻-Aufnahme

Je 10 Oozyten wurden zusammen in 200 µl Versuchslösung für 10 min inkubiert. 200 µl Versuchslösung setzte sich wie folgt zusammen: 178 µl Ba-ORi mit erniedrigter NaCl-Konzentration von 70 mM, 2 µl GABA-Stammlösung (40 mM in H₂O) und 20 µl ³⁶Cl⁻-Stammlösung (90,6 kBq). Das weitere Prozedere entsprach der ³H-GABA-Aufnahme (siehe oben).

2.4.4 Spannungsabhängige ³H-GABA-Aufnahme

Einzelne Oozyten wurden in Ba-ORi auf ein bestimmtes Haltepotential geklemmt. Nach dem Lösungswechsel von GABA-freiem nach GABA-haltigem Ba-ORi wurde 1 µl der ³H-GABA-Stammlösung (37 kBq) in die Messkammer gegeben. In der Messkammer lag nach dem Lösungswechsel kein Lösungsdurchfluß vor. Nach einer Aufnahmezeit (Inkubationszeit) von 10 min wurde zuerst eine Referenzprobe von 5 µl Inkubationslösung entnommen (die Referenzprobe war notwendig, da die Lösung in der Meßkammer kein definiertes Volumen hatte). Dann wurde die Meßkammer mit

Ba-ORi gespült, bis der Haltestrom der Oozyte einen stationären Verlauf erreichte. Die Oozyte wurde der Meßkammer entnommen, viermal in Ba-ORi gewaschen und in 100 µl 5%iger SDS-Lösung aufgelöst. Nach Zugabe von je 2 ml Szintillationslösung wurden die Radioaktivität der Oozyte und der Referenzprobe im Flüssigkeitszintillationszähler für 5 min gemessen.

2.5 Two-Electrode Voltage Clamp

Allgemein bedeutet „Voltage Clamp“, daß ein Potential, das an einem Widerstand abfällt, mittels eines applizierten Stromes bei einem bestimmten Wert fixiert wird. In elektrophysiologischen Experimenten ist dieser Widerstand idealerweise nur die Zellmembran. Realerweise setzt sich dieser Widerstand aus Zellmembran und Komponenten des Schaltkreises (Elektrolytlösungen, Zytosol, Elektroden) zusammen (Schwarz W. und Rettinger J., 2004). Es liegen also mehrere Widerstände in Reihe geschaltet vor, die nach Gleichung 1 als Spannungsteiler fungieren (Abbildung 2.5.1). Wird also in einem Schaltkreis mit nur einer Elektrode gemessen, entspricht das tatsächliche Membranpotential immer nur dem mit Gleichung 1 beschriebenen Bruchteil des vorgegebenen Potentials.

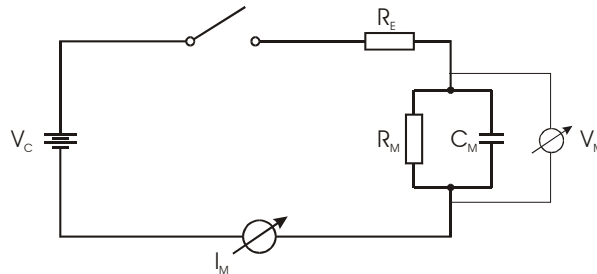
Ist R_M sehr viel größer als R_E gilt die Näherung: $\frac{R_M}{R_E + R_M} = 1$

In diesem Fall ist Voltage Clamp mit nur einer Elektrode durchführbar; das ist z. B. beim Patch Clamp der Fall.

Im Falle ganzer Oozyten gilt diese Näherung nicht. Zu Schaltung 1 muß ein zweiter paralleler Schaltkreis hinzugefügt werden, der das reale Membranpotential mißt (Abbildung 2.5.1). Der zu applizierende Strom kann nun nach Kontrolle der gemessenen Membranspannung reguliert werden. Man spricht vom Two-Electrode Voltage Clamp (TEVC). Um Kontrolle und Regulation des Membranpotentials zu automatisieren, kann man in Schaltung 2 zwei Differenzverstärker einfügen, einen sogenannten Spannungsfolger und einen negativen Rückkopplungsverstärker. Der Spannungsfolger hat drei Aufgaben: (I) Er hält die Potentialelektrode stromfrei; (II) er stellt sicher, daß Potentiale, die an hohen Widerständen abfallen mit Meßgeräten mit kleinen Eingangswiderständen meßbar bleiben; (III) er sorgt dafür, daß das am Clampverstärker eingehende Membranpotential V_M tatsächlich dem Potential an der

Zellmembran entspricht. Der Rückkopplungsverstärker vergleicht das gemessene Membranpotential V_M mit der vorgegebenen Spannung V_C und appliziert einen Strom, um die Differenz zwischen V_M und V_C auszugleichen.

Abbildung 2.5.1

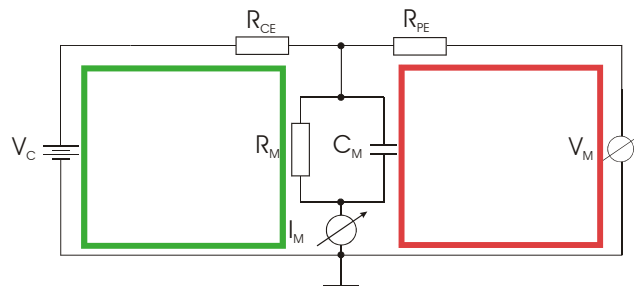


Schaltung 1 ist eine schematische Darstellung eines Ein-Elektroden Voltage Clamp. Zur Vereinfachung sind die im Text genannten Widerstandskomponenten (Elektrolytlösungen, Zytosol, Elektroden) in R_E zusammengefasst.

V_M = Membranpotential, V_C = Clamppotential, I_M = Membranstrom, R_E = Widerstandskomponenten, R_M = Membranwiderstand, C_M = Membrankapazität

Gleichung 1:
$$V_M = V_C * \frac{R_M}{R_E + R_M}$$

Gleichung 1 beschreibt, inwieweit das Membranpotential vom vorgegebenen Klemmpotential abweicht.

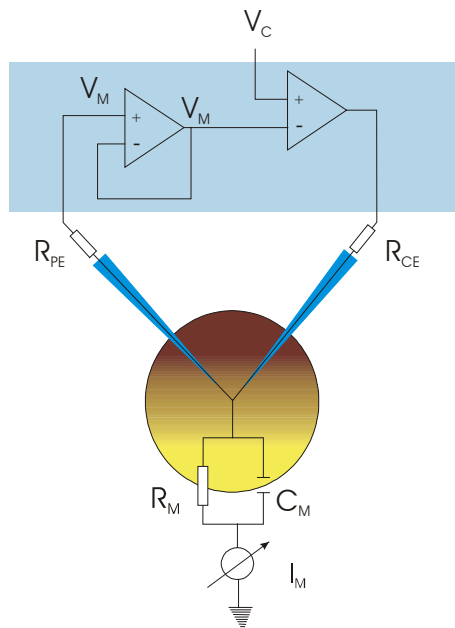


Schaltung 2 zeigt schematisch eine TEVC Schaltung. Der Clampkreislauf zur Applikation des Klemmstroms ist grün markiert, der Meßkreislauf zur Potentialmessung ist rot markiert.

V_M = Membranpotential, V_C = Klemmpotential, I_M = Membranstrom, R_{CE} = Stromelektrode, R_{PE} = Potentialelektrode, R_M = Membranwiderstand, C_M = Membrankapazität

Abbildung 2.5.2 zeigt einen so beschriebenen TEVC Schaltkreis unter Einbezug der Oocyte, die untersucht werden soll. Der automatisierte Abgleich zwischen Klemmpotential und Membranpotential ermöglicht Voltage-Clamp-Messungen mit Zeitkonstanten im Bereich weniger Millisekunden.

Abbildung 2.5.2



Die Abbildung zeigt schematisch den elektrischen Zusammenhang zwischen Voltage-Clamp-Verstärker und Oocyte unter TEVC. Der hellblau hinterlegte Teil des Schaltbildes stellt den Verstärker dar, die braungelbe Kugel die Oocyte. Potential- und Stromelektrode sind dunkelblau markiert. Die Differenzverstärker sind die mit + und – markierten Dreiecke. Der linke Differenzverstärker ist der sogenannte Spannungsfolger, der rechte Differenzverstärker ist der negative Rückkopplungsverstärker des TEVC.

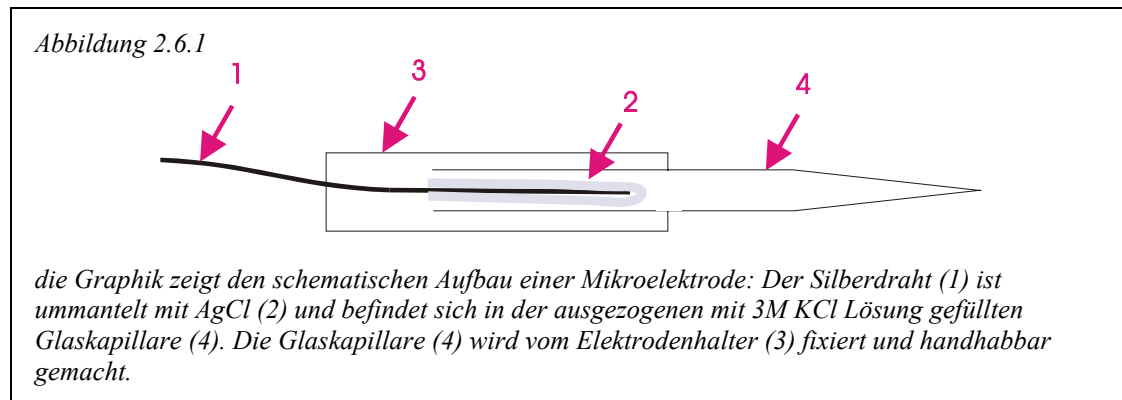
V_M = Membranpotential, V_C = Clamppotential, I_M = Membranstrom, R_{PE} = Widerstand der Potentialelektrode, R_{CE} = Widerstand der Stromelektrode, R_M = Membranwiderstand, C_M = Membrankapazität

2.6 Elektroden

2.6.1 Mikroelektroden

Bei den in Abbildung 2.6.1 und Abbildung 2.6.2 genannten Elektroden handelt es sich um Ag/AgCl Elektroden. Sie stellen die elektrische Brücke zwischen Metalleiter (Drähte und Verstärker) und Elektrolytleiter (Zytosol und Meßlösung) dar. Abbildung 2.6.1 zeigt die schematische Darstellung einer im elektrophysiologischen Experiment genutzten Mikroelektrode. Kernteil ist der mit AgCl beschichtete Silberdraht, der es den Ionen der Lösung ermöglicht, die Elektronen des Metalls als Ladungsträger abzulösen. Wichtig für die störungsfreie Funktion der Elektrode ist die Zusammensetzung der Lösung, die die AgCl-Schicht umgibt (Schwarz W. und Rettinger J., 2004). Im Fall der Elektroden ist die ausgezogene Glaskapillare, in der sich das Kernteil der Elektrode befindet, mit einer 3M KCl Lösung gefüllt. Die Öffnung an der Spitze der Glaskapillare definiert maßgeblich den Widerstand der verwendeten Elektrode. Der Widerstand lag in den Experimenten zwischen 0,5 MΩ und 3 MΩ. Neue Elektroden wurden vor ihrer Verwendung für ca. 15 min mit ihrer Spitze in die Messlösung gehalten, um einen herstellungsbedingten Druckausgleich

und die Einstellung eines Konzentrationsgradienten an der Spitze der Elektrode zu gewährleisten.



2.6.2 Badelektroden und Agarbrücke

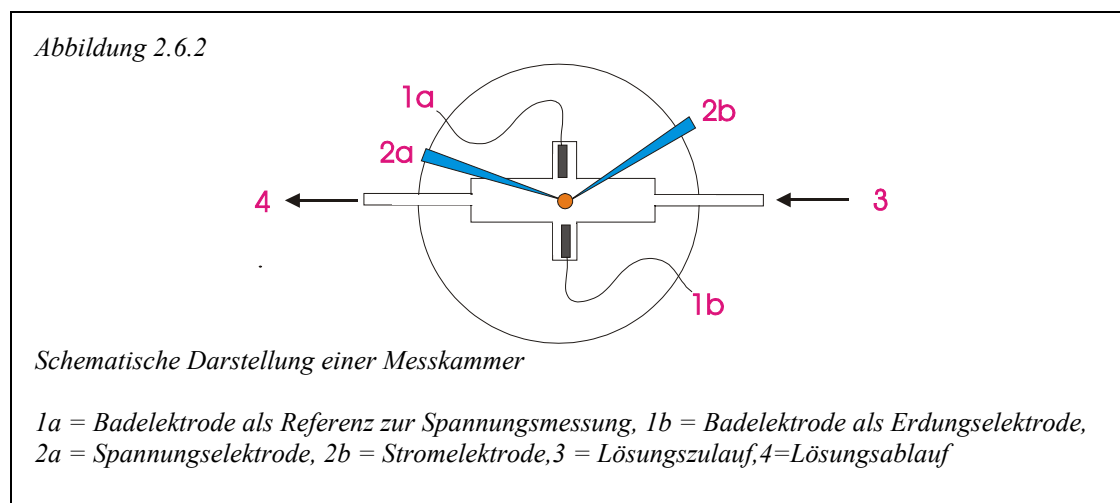
Die Badelektrode ist ein von AgCl ummantelter Silberdraht. Sie wird von der extrazellulären Meßlösung umgeben. Im Gegensatz zur Mikroelektrode ist es wichtig zu beachten, daß abhängig vom Experiment sich die ionale Zusammensetzung der Meßlösung ändern kann. Mit einer Veränderung der Anionenkonzentration ändern sich die Eigenschaften der Badelektrode maßgeblich, was zu Fehlern in der Messung führt. Aus diesem Grund wurden alle Experimente dieser Arbeit, in denen sich die Ionenzusammensetzung der Meßlösung änderte, mit einer Agarbrücke zwischen Meßlösung und Badelektrode durchgeführt. Die Agarbrücke fixiert durch Gelbildung mit einer Agarkonzentration von 0,5% die die Badelektrode umgebende Lösung. Durch die Gelbildung ist so durch Hemmung der freien Diffusion eine Ionenkonzentrationsänderung an der Badelektrode unterbunden, die elektrische Leitfähigkeit bleibt aber weiterhin gewährleistet. Die in dieser Arbeit verwandte Agarbrücke bestand aus 0,5% Agar in Ba-ORi.

Um exakte Meßergebnisse zu erhalten, wurden zwei Badelektroden verwendet. Über die eine fließt der Klemmstrom gegen Erde ab, mit der anderen wird das Badpotential gemessen. Der Grund dafür ist, daß die Meßlösung zwischen Badelektrode und Zelle einen konstanten Widerstand darstellt, an dem ein Potential abfällt. Fließt nun der Klemmstrom über eine Badelektrode ab, verändert sich das Potential des Badwiderstand gemäß dem Ohmschen Gesetz. Bei Verwendung einer einzigen Badelektrode addieren sich nun in der Spannungsmessung zum eigentlichen

Membranpotential ein sich mit dem Klemmstrom änderndes Badpotential. Des weiteren kommt es bei Verwendung einer einzigen Badelektrode durch den Klemmstrom zur Elektrodenpolarisation. Die Spannungsmessung wird so verfälscht. Bei Verwendung zweier Badelektroden erfolgt die Spannungsmessung stromfrei. Es kommt weder zur Elektrodenpolarisation, noch fällt in der Meßkammer ein zusätzlicher variabler Widerstand ab.

2.6.3 Die Meßkammer

Die Meßkammer ist eine längliche rechteckige Kammer mit ca. 500 µl Volumen in einem runden Plexiglasblock. Sie hat einen Zulauf und einen Ablauf, sowie zwei Aussparungen für die Badelektroden. Abbildung 2.6.2 zeigt eine schematische Darstellung der Meßkammer in Aufsicht. Der Lösungszulauf in die Kammer wurde durch Einengung oder Öffnung eines zuführenden Schlauches reguliert und betrug 1-2 ml pro Minute. Der Wechsel unterschiedlicher Lösungen wurde vor der Meßkammer durch Mehrwegehähne bewerkstelligt.



2.7 Auswertung der elektrophysiologischen Daten

Wenn nicht anders erwähnt wurden alle gemessenen Daten möglichst umfassend wie in Kapitel 8.1 ausgewertet und dargestellt. Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Student's t-Test geprüft.

2.8 Material

Software

Origin 7.0	(OriginLab Corp., Northampton, USA)
Cellworks E	(npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland)
Cellworks Reader	(npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland)
Office 2000	(Microsoft, Redmond, USA)
Corel Graphics Suite 9	(Corel Corporation, Ottawa, Kanada)
IQV	(Schwarz, Vasilets, MPIBP Frankfurt, Deutschland)

Geräte

Computer	(PC, AMD Athlon(tm) 1,05 GHz)
x-y Schreiber	(Kipp&Zonen, Bohemia, USA)
Vertikalpuller	(Getra, München, Deutschland)
Oszillograph	(Kikusui Electronics, Yokohama, Japan)
x-y-z Mikromanipulator	(Bachofer, Reutlingen, Deutschland)
Binokular	(Wild Heerbrugg)
Wasseraufbereitung Milli-Q	(Millipore, Eschborn, Deutschland)
Aquariumspumpe	(Zoofachhandel)
Nanoliterpumpe	(Drummond Scientific Company, Broomall, USA)
Kaltlichtquelle KL 1500	(Schott, Mainz, Deutschland)
Szintillationsflüssigkeitszähler	(Packard Instrument Company, Meriden, USA)
TEVC Verstärker TEC-03	(npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland)
Interface INT-20	(npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland)
Elektrodenhalter	(npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland)
Einmalspritzen	(Braun, Melsungen, Deutschland)
Injektionszubehör	(Braun, Melsungen, Deutschland)
Dreiwegehähne	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Glaskapillaren TEVC 1,5mm	(Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland)
Glaskapillaren Pumpen 1,2 mm	(Hilgenbberg, Malsfeld, Deutschland)

Injektionskammer	(MPI Werkstatt)
Messkammer	(MPI Werkstatt)
Inkubationsgefäße für radioaktive Aufnahmemessung	(Sartstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Kulturschalen	(Nunc, Wiesbaden, Deutschland)
Szintillationsröhrchen	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
164µm Spritzennadel	(WPI, Berlin, Deutschland)

Chemikalien

BaCl ₂	(Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
MgCl ₂	(Fluka, Taufkirchen, Deutschland)
CaCl ₂	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
NaCl	(Fluka, Taufkirchen, Deutschland)
KCl	(Fluka, Taufkirchen, Deutschland)
Na-Gluconat	(Fluka, Taufkirchen, Deutschland)
K-Gluconat	(Fluka, Taufkirchen, Deutschland)
TMAacetat	(Fluka, Taufkirchen, Deutschland)
3-morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	(Fluka, Taufkirchen, Deutschland)
Sucrose	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Ouabain	(Fluka, Taufkirchen, Deutschland)
Mineralöl	(Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
γ-Aminobuttersäure (GABA)	(Fluka, Taufkirchen, Deutschland)
SKF-89976-A	(Smithkline Beecham, London, England)
Nipicotinsäure	(Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
Amitriptylin	(Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
Imipramin	(Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
Doxepin	(Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
Promethazin	(Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
Fluvoxamin	(Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
Fluoxetin	(Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

Phorbol-12-myristat- 13-acetat

(PMA) (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

Okadaic acid (Calbiochem/Merck, Darmstadt, Deutschland)

Calphostin C (Biomol, Hamburg, Deutschland)

3-Isobuthyl-1-methylxanthin

(IBMX) (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

Forskolin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

Proteinkinase C, katalytisches Fragment, Rattenhirn

(PKC) (Biomol, Hamburg, Deutschland)

Proteinphosphatase 2B, human, rekombinant (E.coli)

(PP2B) (Calbiochem/Merck, Darmstadt, Deutschland)

^3H -GABA (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England)

^{14}C -Sucrose (NEN/ Dupont, Köln, Deutschland)

$^{36}\text{Cl}^-$ (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England)

$^{22}\text{Na}^+$ (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England)

Szintillationslösung (LUMAC, Groningen, Niederlande)

RNA-Synthese-Kit (Ambion Inc., Huntingdon, England)

Tricain (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

Collagenase (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

Liberase (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

 Na^+ -Dodecylsulfat

(SDS) (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

humane RNA (Die gesamt verwendete humane RNA wurde erhalten von Prof. Dr. Ulrich Mußhoff und Prof. Dr. E.J. Speckman, Institut für Physiologie 1, Westfälische Wilhelms-Universität Münster)

3 Der langsame transiente Strom

3.1 Einleitung

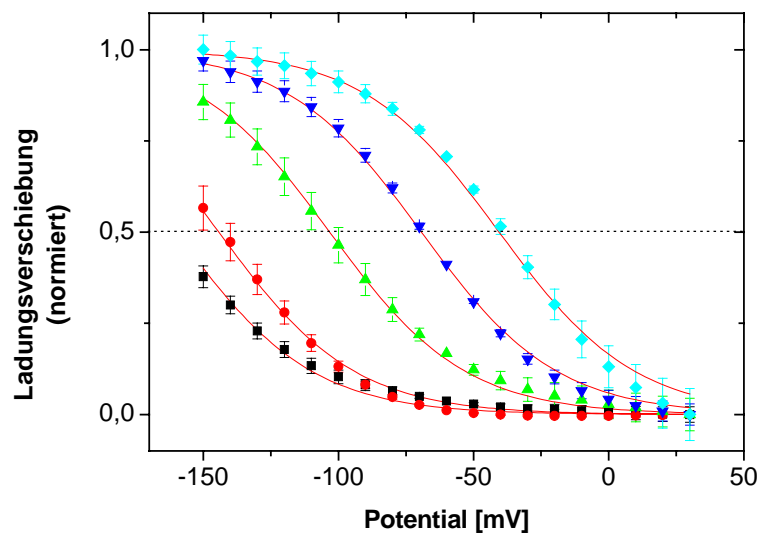
Der langsame transiente Strom des GAT1 wird in der Literatur einem der Bindung von einem oder zwei Na^+ -Ionen assoziierten Prozeß zugeschrieben (Mager S. et al., 1996 ; Lu C. et al., 1999b). Nach dem von Hilgemann et al. postulierten Transportzyklus des GAT1 (Hilgemann D. et al., 1999) bindet ein Na^+ -Ion eindeutig vor der GABA-Bindung; das zweite Na^+ -Ion scheint erst zusammen mit GABA an den Transporter zu binden und dann sofort die Membran zu passieren. Das hieße, daß der langsame transiente Strom durch die Bindung des ersten Na^+ -Ions verursacht wird. Mager et al. hingegen konnten durch Messung der Ladungsverschiebung in Abhängigkeit der Na^+ -Konzentration Hinweise finden, daß der langsame transiente Strom durch die Bindung zweier Na^+ -Ionen verursacht wird. Es zeigt sich, daß trotz relativ detaillierter Vorstellungen von der Funktionsweise des GAT1 einzelne Schritte des Transportzyklus nach wie vor unklar oder zumindest strittig sind. Auch über die Rolle des Cl^- im Transportzyklus besteht keine Einigkeit. Einerseits wird beschrieben, daß der GAT1-vermittelte Transport Cl^- -abhängig sei (Kavanaugh M. et al., 1992 ; Hilgemann D. et al., 1999), andererseits wird nur von einer bedingten Cl^- -Abhängigkeit gesprochen (Mager S. et al., 1993). Es gibt unterschiedliche Modelle eines Transportzyklus für den GAT1, die die Rolle des Cl^- im GABA-Transportzyklus erklären sollen. Hilgemann et al. schlagen einen GABA / Cl^- -Kotransport vor (Hilgemann D. et al., 1999). Loo et al. hingegen beschreiben einen Cl^- -Austausch (Loo D. et al., 2002). Desweiteren existiert die Idee eines vom GABA-Transport selbst abgekoppelten Cl^- -Einwärtstransports, der dem GAT1 seine Ausgangskonformation zurückgibt (Bicho A., 2004).

Detailliertes Wissen über die Ionenbindungssequenz kann helfen, Klarheit über den Transportzyklus des GAT1 zu gewinnen. Zu diesem Zweck wurden die transienten Ströme des mGAT1 in Abhängigkeit der Cl^- - bzw. Na^+ -Ionenkonzentration aufgenommen und hinsichtlich der Ladungsverschiebung und deren Rate analysiert.

3.2 Resultate und Diskussion

Zur detaillierten Untersuchung des Einflusses extrazellulärer Na^+ -Konzentrationen auf den langsamen transienten Strom des mGAT1 wurden Messungen der transienten Ströme bei 5, 10, 20, 50 und 90 mM Na^+ durchgeführt. Sinkende Na^+ -

Abbildung 3.2.1



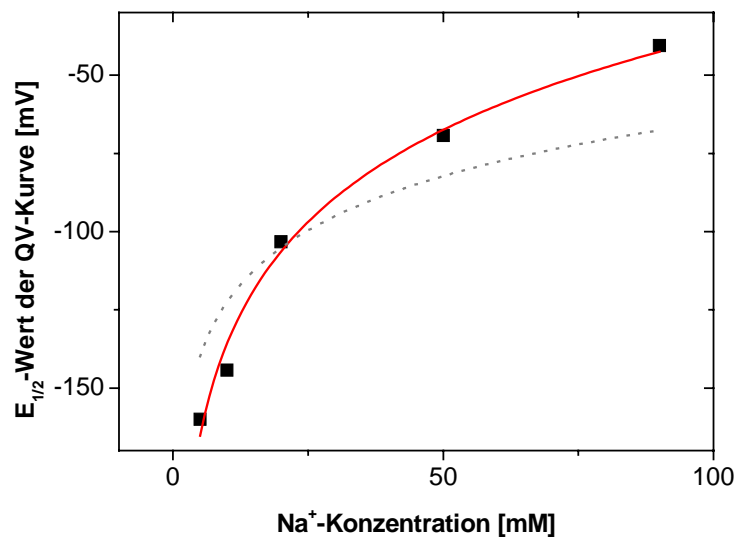
Die Abbildung stellt die normierten QV-Kurven in Abwesenheit von GABA bei Na^+ -Konzentrationen von 5 mM (■), 10 mM (●), 20 mM (▲), 50 mM (▼), und 90 mM (◆) dar. Es handelt sich um Mittelwerte von 5 – 15 Oozyten \pm SEM. Normiert wurde auf die Maximalamplitude Q_{total} der Ladungsverschiebung. Die roten Linien sind Kurvenanpassungen nach Fermi (Gleichung 2). Zur Berechnung wurden $Q_{\text{max}}=1$, $Q_{\text{min}}=0$ und $z_F=1$ gewählt. Die gepunktete Linie zeigt die $E_{1/2}$ -Werte der QV-Kurven bei den unterschiedlichen Na^+ -Konzentrationen an.

Konzentrationen verschieben die QV-Kurven (siehe Kapitel 8.1.4) zu negativeren Potentialen (Abbildung 3.2.1). Die durch Kurvenanpassung nach Fermi (Gleichung 2, siehe Kapitel 8.2) erhaltenen $E_{1/2}$ -Werte für die einzelnen Na^+ -Konzentrationen werden in Abbildung 3.2.2 gegen die dazugehörige Na^+ -Konzentrationen aufgetragen. Nach Kurvenanpassung mit (Gleichung 3, siehe Kapitel 8.2) erhält man für diese Kurve einen Hill-Koeffizienten von $n=1,7$. Dies deutet auf die Bindung von mehr als einem Na^+ -Ion hin. Kurvenanpassung mit Gleichung 3 und einem vorgegebenen Hill-Koeffizienten von 1 waren nicht möglich; die Abweichung der angepassten Kurve von

den gemessenen Werten war so groß, daß die Bindung eines einzigen Na^+ -Ions als Ursache für den langsamen transienten Strom des mGAT1 nicht angenommen werden kann (siehe gepunktete Kurve, Abbildung 3.2.2).

Gleichung 3
$$E_{1/2} = \frac{RT}{zF} * \ln \left(\frac{[\text{Na}^+]}{K_m} \right)^{n_{\text{Hill}}}$$

Abbildung 3.2.2

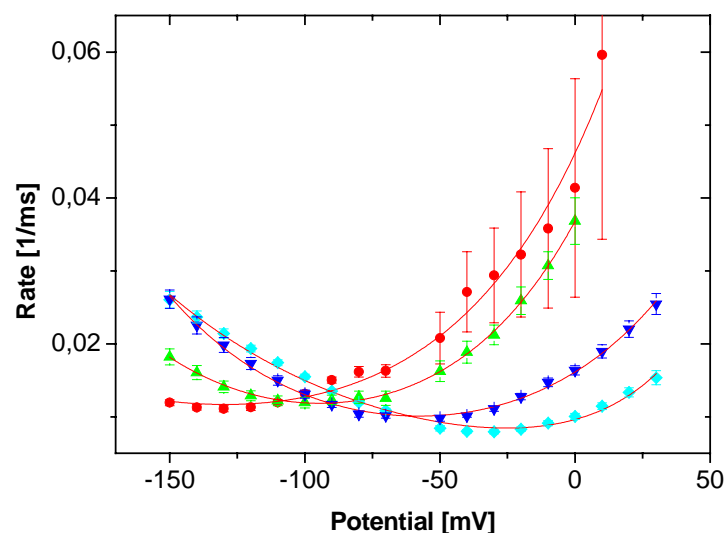


Die Abbildung zeigt die graphische Darstellung der aus Abbildung 3.2.1 erhaltenen $E_{1/2}$ -Werte in Abhängigkeit der Na^+ -Konzentration. Die rote durchgehende Linie und die graue gepunktete Linie stellen Kurvenanpassungen nach Gleichung 3 dar. Die nach der Kurvenanpassung erhaltenen Parameter n_{Hill} und K_m entsprechen in ihrer Bedeutung den selben Parametern der Hill-Gleichung. Bei Kurvenanpassung der roten Kurve wurde die Findung der Parameter nicht beeinflusst. Hier zeigt der Hill-Koeffizient n_{Hill} einen Wert von $n=1,7$ und der K_m -Wert für Na^+ einen Wert von 245 mM. Bei der grau gepunkteten Kurve wurde n_{Hill} bei 1 fixiert; der K_m -Wert für Na^+ nahm in diesem Fall einen Wert von 1343 mM an.

Die Analyse der Na^+ -Abhängigkeit der Raten zeigt (Abbildung 3.2.3) (siehe Kapitel 8.1.4), daß sowohl der durch die Na^+ -Bindung dominierte linke Ast der RateV-Kurven (Raten bei Potentialen < -50 mV) als auch der durch die Na^+ -Dissoziation dominierte rechte Ast der RateV-Kurven (Raten bei Potentialen > -50 mV) durch die Na^+ -Konzentration signifikant beeinflusst werden. Nach Kurvenanpassung mit Gleichung 4 (siehe Kapitel 8.2) wird deutlich, daß die Ratenbindungskonstante k_{bind} mit steigender Na^+ -Konzentration größer wird. Die Ratendissoziationskonstante k_{diss}

sinkt mit steigender Na^+ -Konzentration. In der Tabelle in Abbildung 3.2.3 ist nur im Fall der Ratendissoziationskonstanten k_{diss} eine eindeutige kontinuierliche Na^+ -Abhängigkeit zu erkennen. Fixiert man die Ratenbindungskonstanten k_{bind} bei einem gemeinsamen Wert, ist eine Kurvenanpassung nicht mehr möglich. Die effektiven Valenzen z_{bind} und z_{diss} hingegen konnten während der Kurvenanpassung bei gemeinsamen Werten fixiert werden. Kurvenanpassungen mit fixierten effektiven Valenzen ergaben keine deutlich abweichenden Kurven. Das bedeutet, daß sich mit abnehmender extrazellulärer Na^+ -Konzentration der der Na^+ -Bindung assoziierte Schritt verlangsamt und daß der der Na^+ -Dissoziation assoziierte Schritt mit abnehmender extrazellulärer Na^+ -Konzentration beschleunigt wird.

Abbildung 3.2.3



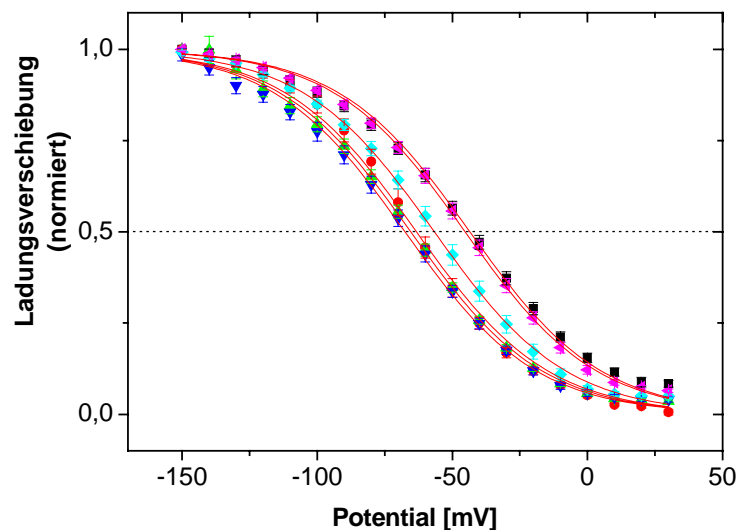
Die Abbildung zeigt die RateV-Kurven in Abwesenheit von GABA bei Na^+ -Konzentrationen von 10 mM (●), 20 mM (▲), 50 mM (▼), und 90 mM (◆). Es handelt sich um Mittelwerte von 5 – 15 Oozyten \pm SEM.

Die roten Linien stellen Anpassungen nach Gleichung 4 dar. Folgende Tabelle zeigt die Resultate der Kurvenanpassung.

Na^+ -Konz [mM]	k_{bind} [1/ms]	z_{bind}	k_{diss} [1/ms]	z_{diss}
10	0,002	0,25	0,044	0,45
20	0,0013	0,42	0,0355	0,5
50	0,0019	0,43	0,014	0,46
90	0,0045	0,297	0,00511	0,759

Zur detaillierten Untersuchung des Einflusses extrazellulärer Cl^- -Konzentrationen auf den langsamen transienten Strom des mGAT1 wurden Messungen der transienten Ströme bei 0, 5, 10, 20, 50 und 90 mM Cl^- durchgeführt. Sinkende Cl^- -Konzentrationen verschieben die QV-Kurven zu negativeren Potentialen (Abbildung 3.2.4). Da es kein konkretes Modell für die Cl^- -Bindung am mGAT1 gibt, das die Ursache für die transienten Ströme beschreiben könnte, war es nicht möglich, eine Kurvenanpassung der Verschiebung der $E_{1/2}$ -Werte analog zu Abbildung 3.2.2 durchzuführen. Offensichtlich ist jedoch, daß eine verringerte Cl^- -Konzentration die QV-Kurve wesentlich weniger beeinflusst, als eine um die gleiche Differenz verringerte Na^+ -Konzentration.

Abbildung 3.2.4

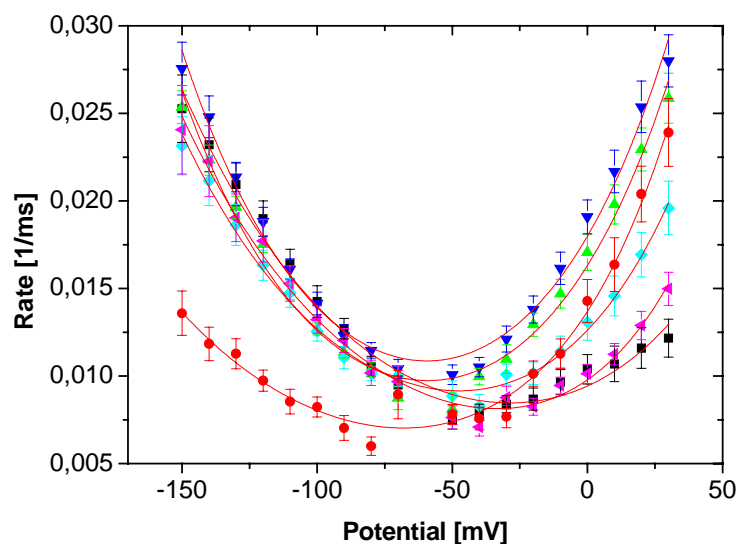


Die Abbildung zeigt die normierten QV-Kurven in Abwesenheit von GABA bei Cl^- -Konzentrationen von 0 mM (●), 5 mM (▲), 10 mM (▼), 20 mM (◆), 50 mM (◆), und 90 mM (■). Es handelt sich um Mittelwerte von 5 – 15 Oozyten \pm SEM. Normiert wurde auf die Maximalamplitude der Ladungsverschiebung Q_{total} . Die roten Linien sind Kurvenanpassungen nach Fermi (Gleichung 2). Zur Berechnung wurden $Q_{\text{max}}=1$, $Q_{\text{min}}=0$ und $z_F=1$ gewählt. Die gepunktete Linie zeigt die $E_{1/2}$ -Werte der QV-Kurven bei den unterschiedlichen Cl^- -Konzentrationen an.

Die Analyse der Raten zeigt, daß sowohl der durch die Na^+ -Bindung dominierte Ast der RateV-Kurven als auch der durch die Na^+ -Dissoziation dominierte Ast der RateV-

Kurven durch die Cl^- -Konzentration signifikant beeinflusst werden (Abbildung 3.2.5). Dabei fällt auf, daß die Raten bei Potentialen > -50 mV (d. h., die Raten, die der Na^+ -Dissoziation assoziiert sind) durch steigende Cl^- -Konzentrationen reduziert werden, wohingegen die Raten bei Potentialen < -50 mV (d. h., die Raten, die der Na^+ -Bindung assoziiert sind) nur bei Cl^- -Konzentrationen kleiner als 5 mM reduziert werden. Sich ändernde Cl^- -Konzentrationen größer als 5 mM beeinflussen die Raten bei Potentialen < -50 mV nicht. Nach Kurvenanpassung mit Gleichung 4 scheinen insbesondere die Ratenbindungskonstante k_{bind} und die Ratendissoziationskonstante k_{diss} reguliert zu sein, wobei sich k_{bind} mit abnehmender extrazellulärer Cl^- -Konzentration verlangsamt und k_{diss} beschleunigt.

Abbildung 3.2.5



Die Abbildung zeigt die RateV-Kurven in Abwesenheit von GABA bei Cl^- -Konzentrationen von 0 mM (●), 5 mM (▲), 10 mM (▼), 20 mM (◆), 50 mM (◆), und 90 mM (■). Es handelt sich um Mittelwerte von 5 – 15 Oozyten \pm SEM. Die roten Linien stellen Anpassungen nach Gleichung 4 dar. Folgende Tabelle zeigt die Resultate der Kurvenanpassung.

Cl^- -Konz. [mM]	k_{bind} [1/ms]	z_{bind}	k_{diss} [1/ms]	z_{diss}
0	0,0017	0,34	0,012	0,55
5	0,0018	0,44	0,015	0,48
10	0,002	0,44	0,016	0,46
20	0,0027	0,35	0,0099	0,5
50	0,0033	0,34	0,006	0,58
90	0,0033	0,34	0,006	0,47

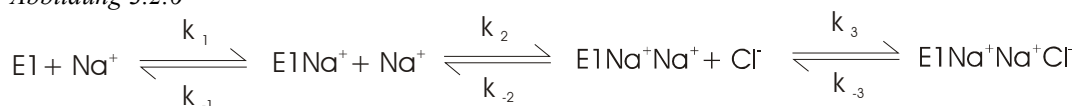
Zwar scheinen in der Tabelle in Abbildung 3.2.5 auch die effektiven Valenzen reguliert zu sein; da aber eine Kurvenanpassung mit fixierten Valenzen, nicht jedoch mit fixierten Ratenkonstanten möglich ist, muß man davon ausgehen, daß die effektiven Valenzen nicht maßgeblich reguliert werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß schon vor der GABA-Bindung Na^+ und Cl^- mit dem mGAT1 interagieren. Dabei zeigt Abbildung 3.2.2, daß mindestens zwei Na^+ -Ionen an den mGAT1 binden, bevor GABA bindet.

Auch um die Na^+ -Abhängigkeit des der Na^+ -Dissoziation assoziierten (rechten) Asts der RateV-Kurve zu erklären, muß eine Bindung mindestens zweier Na^+ -Ionen angenommen werden; nur die sequenzielle Bindung mehrerer Na^+ -Ionen kann eine Na^+ -abhängige Na^+ -Dissoziation erklären.

Die gemessenen Daten lassen keine Rückschlüsse darüber zu, ob die langsamen transienten Ströme tatsächlich durch die Ladung der gebundenen Ionen generiert werden oder ob sich endogene Ladungen des mGAT1, wie geladene Aminosäuren oder Dipole, durch Konformationsänderungen im elektrischen Feld bewegen. Um die Beeinflussung der RateV-Kurve durch unterschiedliche Cl^- -Konzentrationen zu erklären besteht ebenso wie bei der Na^+ -abhängigen Regulation nur die Möglichkeit, die beobachteten Effekte durch eine Cl^- -Bindung vor der GABA-Bindung im Transportzyklus zu erklären.

Abbildung 3.2.6



Die Abbildung stellt nur eine Möglichkeit dar, die oben vorgestellten Resultate zu erklären. Durch die sequentielle Bindung des Na^+ kann der mGAT1 zwei Zustände einnehmen, E1Na^+ und $\text{E1Na}^+\text{Na}^+$, deren Entstehungsgeschwindigkeit und Entstehungswahrscheinlichkeit durch die Na^+ -Konzentration beeinflusst wird. Bei niedrigen Na^+ -Konzentrationen ist die Entstehung von E1Na^+ bevorzugt, wohingegen bei größeren Na^+ -Konzentrationen die Entstehung von $\text{E1Na}^+\text{Na}^+$ bevorzugt ist. Unter der Annahme, daß die Zerfallsrate k_{-2} deutlich langsamer ist als die Zerfallsrate k_{-1} , läßt sich eine beschleunigte gemessene Dissoziationsrate bei niedrigen Na^+ -Konzentrationen erklären. Bei steigenden Cl^- -Konzentrationen wird das Gleichgewicht von E1Na^+ zu $\text{E1Na}^+\text{Na}^+\text{Cl}^-$ verschoben; d. h., die gemessene Dissoziationsrate wird verlangsamt. Durch diesen Effekt ließe sich auch die erhöhte Na^+ -Affinität bei erhöhten Cl^- -Konzentrationen erklären.

Die Verlangsamung der Bindungsrate bei Cl^- -Konzentrationen kleiner als 5 mM kann durch dieses Modell nicht erklärt werden.

Abgesehen von der Regulation des der Na^+ -Bindung assoziierten Asts der RateV-Kurve in Abhängigkeit der Cl^- -Konzentration bietet das Modell in Abbildung 3.2.6 eine einfache Möglichkeit, die beschriebenen Beobachtungen in Übereinstimmung mit anderen publizierten Ergebnissen zu erklären (Hilgemann D. et al., 1999 ; Mager S. et al., 1996).

4 Der Kanal-Modus

4.1 Einleitung

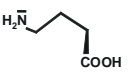

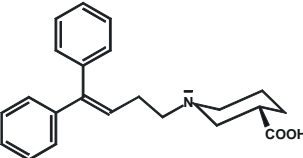
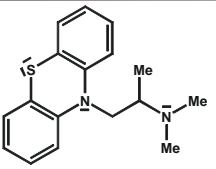
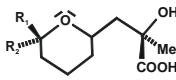
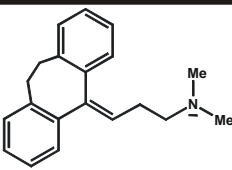
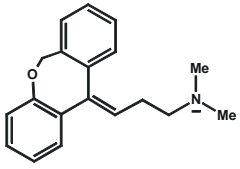
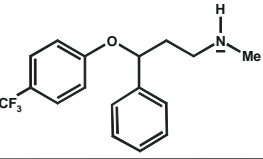
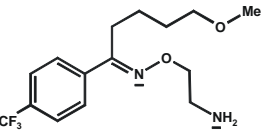
In der Familie der Na^+/Cl^- -abhängigen Neurotransmittertransporter besitzen die meisten Mitglieder neben der Aminosäure-Sequenzhomologie und ähnlichen Struktur-Wirkungsbeziehungen (Masson J. et al., 1999) eine weitere wichtige gemeinsame Eigenschaft: Der durch den Transporter vermittelte Gesamtstrom kann in drei Komponenten unterteilt werden: (I) den Transportstrom, (II) den Transporter-assoziierten Strom und (III) den Kanalstrom (Sonders M. et al., 1996). Der Transportstrom wird generiert durch den Einwärtstransport der Nettoladung, die durch die fixe Stöchiometrie des Substrates und seiner kotransportierten Ionen, Na^+ und Cl^- , definiert ist. Der Transporter-assoziierte Strom ist nicht an den Transport von Substrat gebunden; allerdings ist die Anwesenheit des Substrats unabdingbar, damit sich ein Transporter-assoziiierter Strom entwickeln kann. Bis heute ist der Mechanismus dieses Stroms unbekannt. Transportstrom und Transporter-assoziiierter Strom treten nur in Gegenwart von GABA auf. Die Summe dieser zeitgleich auftretenden Komponenten wird im folgenden „mGAT1-vermittelter Strom“ genannt. Die dritte Komponente, der Kanalstrom, spielt nur in der Abwesenheit von Substrat eine Rolle. Es scheint sich hierbei um eine Einwärtsleitfähigkeit für Alkaliionen zu handeln (Sonders M. et al., 1996). Im Fall des GAT1 konnten Einzelkanalereignisse in Abwesenheit von GABA beobachtet werden (Cammack J. et al., 1996).

Die drei hier vorgestellten Stromkomponenten konnten sicher beschrieben werden für den Dopamin Transporter (Sonders M. et al., 1997), den Norepinephrin Transporter (Galli A. et al., 1995 ; Galli A. et al., 1996) und den Serotonin Transporter (SERT) (Galli A. et al., 1997 ; Mager S. et al., 1993). Der Strom des Glycin Transporters scheint nur aus dem Transportstrom zu bestehen (Aragon C. et al., 2003). Über den GAT1 ist hinsichtlich des Transporter-assoziierten Stroms wenig bekannt. Bis heute sind lediglich indirekte Hinweise auf einen Transporter-assoziierten Strom veröffentlicht (Risso S. et al., 1996).

Von dem Antiepileptikum Tiagabin ist bekannt, daß es den mGAT1-vermittelten Gesamtstrom in ca. 6-fach geringerer Konzentration blockiert, als die GABA-Aufnahme (Eckstein-Ludwig U. et al., 1999). SKF-89976-A (SKF), ein Struktur-analogon von Tiagabin, das häufig als spezifischer GAT1-Inhibitor Verwendung findet (Borden L. et al., 1994), soll hier in Bezug auf seine inhibierenden

Eigenschaften des mGAT1-vermittelten Stroms und der GABA-Aufnahme mit der Zielsetzung untersucht werden, ob es möglich ist, SKF als spezifischen Inhibitor für eine der oben beschriebenen Stromkomponenten einzusetzen. Dazu wurden die Effekte der in Abbildung 4.1.1 gezeigten Substanzen mit radioaktiven Aufnahmemessungen und elektrophysiologischen Methoden untersucht. Die Auswahl der Substanzen erfolgte unter strukturellen und funktionellen Gesichtspunkten. Da SKF als Derivat der Nipecotinsäure (NA) anzusehen ist, wurde die Struktur von SKF unterteilt in das GABA-analoge Strukturmotiv der NA und in ein planares Strukturmotiv, das über einen Abstandhalter von 3 C-Atomen mit NA verbunden ist. Um die beiden Struktur motive einzeln zu untersuchen, wurden NA als „Muttersubstanz“ und Promethazin (PMZ) als eine dem planaren Ringsystem analoge Substanz ausgewählt. Unter funktionellem Gesichtspunkt wurden Amitriptylin (AMI), Doxepin (DOX), Fluoxetin (FLUOX) und Fluvoxamin (FLUVOX) untersucht. Sie gehören zur Gruppe der Antidepressiva, deren Wirkung mit dem SERT in Verbindung gebracht wird. Da auch AMI und DOX aus einem dem planaren SKF-Motiv ähnlichen System bestehen, spielten hier auch Überlegungen struktureller Art eine Rolle. Es sollte vor dem Hintergrund, daß der GAT1 und der SERT in Aminosäuresequenz und Struktur-Wirkungsbeziehung ähnlich sind, im Vergleich mit SKF untersucht werden, ob ihre Struktur motive allein SERT-spezifische Eigenschaften aufweisen oder allgemein Membranproteine aus der Familie der Na^+/Cl^- -abhängigen Neurotransmittertransporter inhibieren. Da auch die Substanzen mit dem planaren Ringsystem mit der Serotoninwiederaufnahme in Verbindung gebracht werden, wäre eine eventuelle Wirkung des planaren Rests des SKF am mGAT1 erklärbar.

Abbildung 4.1.1

		TEVC	GABA Aufnahme
GABA		+	+
NA		+	+
SKF		+	+
PMZ		+	+
OA		+	+
AMI		-	+
DOX		-	+
FLUOX		-	+
FLUVOX		-	+

Die Abbildung ermöglicht einen Vergleich der Strukturformeln der untersuchten Substanzen. Deutlich wird, daß nur NA, SKF und OA eine GABA-analoge Teilstruktur besitzen. SKF besteht aus einer Kombination aus planarem Ringsystem und GABA-analoger Teilstruktur. Die untersuchten Substanzen PMZ, AMI und DOX bestehen aus nur einem planaren Ringsystem, ähnlich dem von SKF, das über einen Abstand von 2 oder 3 C-Atomen an eine basische Aminogruppe gebunden ist. Diese Substanzen wurden aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften untersucht. Die selektiven SERT-Inhibitoren FUOX und FLUVOX sind nicht mit SKF vergleichbar und wurden nur aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften untersucht. Die letzten beiden Spalten der Tabelle zeigen an, ob Untersuchungsergebnisse nur mit radioaktiven Aufnahmemessungen oder mit radioaktiven Aufnahmemessungen und elektrophysiologischen Methoden vorliegen.

4.2 Resultate

4.2.1 Nipecotinsäure

Der durch 400 μM GABA hervorgerufene mGAT1-vermittelte Strom wird in Abhängigkeit der NA-Konzentration inhibiert (Abbildung 4.2.1) (siehe Kapitel 8.1.3). Unter der Annahme, daß es sich bei NA um einen kompetitiven Inhibitor des mGAT1-vermittelten Stroms handelt, konnten Kurven nach Gleichung 5 an die Meßergebnisse aus Abbildung 4.2.1 angepaßt werden. Daß es sich um einen kompetitiven Inhibitor für den mGAT1-vermittelten Strom handelt, konnte in Abbildung 4.2.3B durch die Wahl einer zu hohen NA-Konzentration zwar nicht gezeigt werden, die Strukturanalogie zu GABA (Abbildung 4.1.1) und die damit verbundene GABA-typische Aktivierung (Abbildung 4.2.2A) des mGAT1 legen jedoch nahe, daß NA ein kompetitiver Inhibitor des mGAT1 ist. Weiteres Indiz für eine kompetitive Inhibition ist die treffende Beschreibung der gemessenen Werte durch die aus Gleichung 5 erhaltenen Parameter.

$$\text{Gleichung 5} \quad I = I_{\max} \frac{\frac{[GABA]}{K_m}}{1 + \frac{[GABA]}{K_m} + \frac{[Inhibitor]}{K_I}}$$

Gleichung 5 beschreibt eine kompetitive Inhibition. Dabei liegt der K_I -Wert für NA unabhängig von der Spannung bei 1 μM . Um bei 400 μM GABA halbmaximale Inhibition des mGAT1-vermittelten Stroms zu erreichen, muß eine Konzentration von 25,5 μM NA eingesetzt werden. Um hingegen bei GABA-Aufnahmemessungen eine halbmaximale Inhibition zu erreichen, muß eine Konzentration von 384 μM NA eingesetzt werden. Beide IC_{50} -Werte sind aus Abbildung 4.2.1B abgelesen.

Abbildung 4.2.1

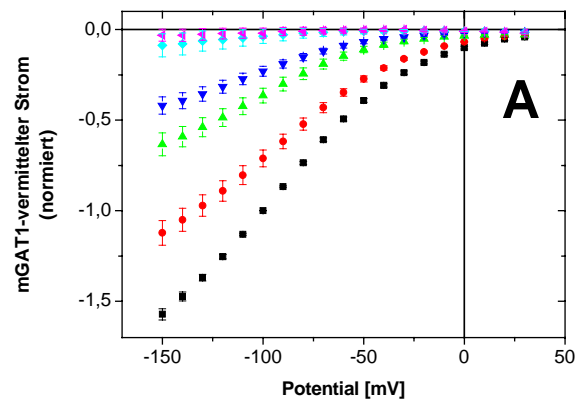


Abbildung (A) zeigt die IV-Kurven in Gegenwart von 400 μM GABA bei NA-Konzentrationen von 0 μM (■), 10 μM (●), 50 μM (▲), 100 μM (▼), 250 μM (◆) und 500 μM (◆). Es handelt sich um normierte und gemittelte Meßwerte von 3-11 Oozyten \pm SEM. Normiert wurde auf den Strom bei -100 mV in Gegenwart von 400 μM GABA in Abwesenheit von NA.

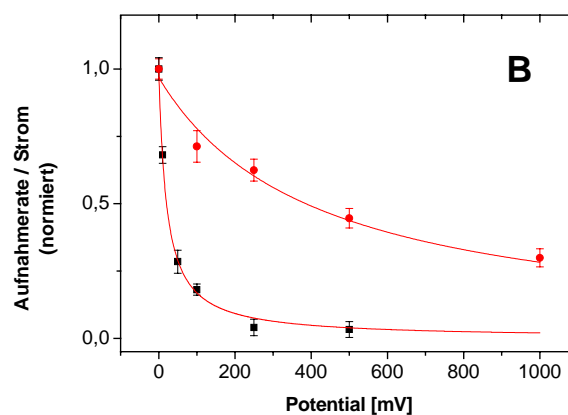


Abbildung (B) zeigt die ^3H -GABA-Aufnahme (●) und den Strom bei -20 mV (■) in Abhängigkeit der NA-Konzentration. Die Werte des Stroms wurden aus Abbildung A entnommen und bei einer NA-Konzentration von 0 μM auf 1 normiert; die Werte der Aufnahme- und Stromrate sind normierte und gemittelte Meßergebnisse von 20 Oozyten \pm SEM. Die roten Linien sind Kurvenanpassungen nach Gleichung 5. (Parameter: siehe Text, Tabelle 4.3.1)

NA selbst ruft einen spannungsabhängigen Strom am mGAT1 hervor (Abbildung 4.2.2). Der K_m -Wert für NA allein ist wie der von GABA spannungsabhängig (Abbildung 4.2.2B). Beide K_m -Spannungsabhängigkeiten lassen sich im Bereich von -130 mV bis +30 mV fast ohne Differenz überlagern. Der in Abbildung 4.2.2B erkennbare Unterschied zwischen den beiden K_m V-Kurven kann aufgrund der fehlerbehafteten Messungen und Kurvenanpassungen nicht als ausschlaggebende Differenz betrachtet werden. Nur bei Potentialen negativer als -130 mV scheinen beide Kurven voneinander abzuweichen. Der durch NA hervorgerufene mGAT1-

vermittelte Strom ist kleiner als der durch GABA hervorgerufene Strom. Er erreicht bei einer Sättigungskonzentration von 250 μM NA im Bereich von -150 mV bis 0 mV nur ca. 55% bis 60% des durch 400 μM GABA hervorgerufenen Stroms. Da sich der durch GABA- bzw. der durch NA-vermittelte Strom bei Potentialen größer 0 mV 0 nA nähert, ist in diesem Bereich eine prozentuale Angabe der Stromdifferenz nicht sinnvoll.

Abbildung 4.2.2

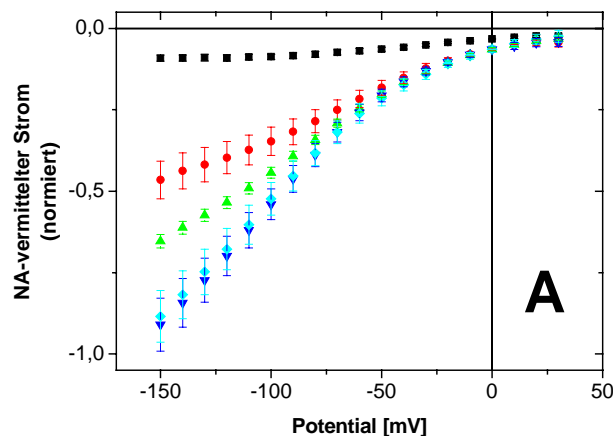


Abbildung (A) zeigt die IV-Kurven in Abwesenheit von GABA bei NA-Konzentrationen von $0\text{ }\mu\text{M}$ (\blacksquare), $10\text{ }\mu\text{M}$ (\bullet), $50\text{ }\mu\text{M}$ (\blacktriangle), $100\text{ }\mu\text{M}$ (\blacktriangledown), $250\text{ }\mu\text{M}$ (\blacklozenge) und $500\text{ }\mu\text{M}$ (\blacktriangledown). Es handelt sich um normierte und gemittelte Meßwerte von 3-11 Oozyten \pm SEM. Normiert wurde auf den Strom bei -100 mV in Gegenwart von $400\text{ }\mu\text{M}$ GABA in Abwesenheit von NA.

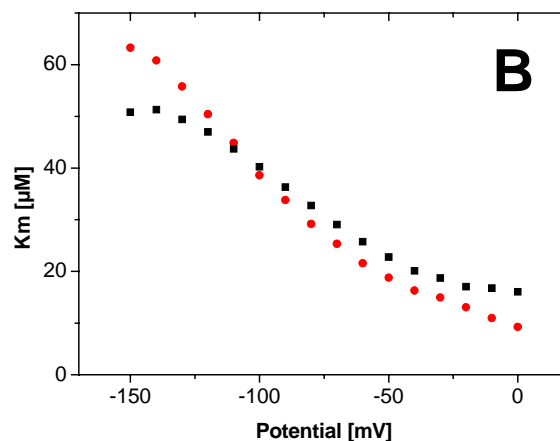


Abbildung (B) zeigt die Spannungsabhängigkeit der K_m -Werte von NA (\bullet) und GABA (\blacksquare) am mGAT1. Die K_m -Werte wurden durch Kurvenanpassung nach Michaelis-Menten (Gleichung 6) an die Daten von Abbildung 4.2.2A erhalten.

Abbildung 4.2.3

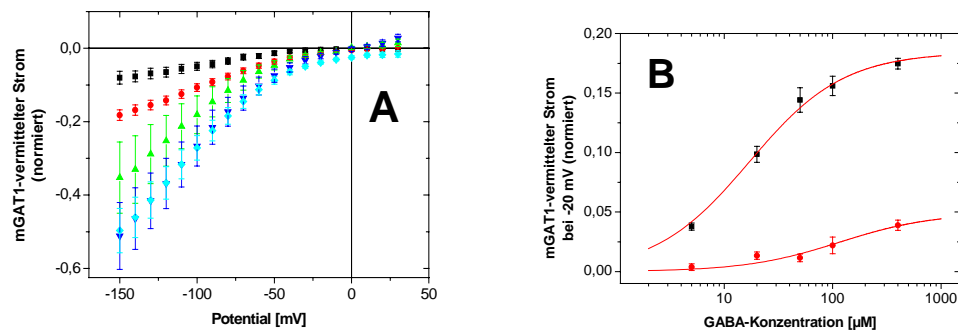


Abbildung (A) zeigt die IV-Kurven in Gegenwart von 100 μM NA bei GABA-Konzentrationen von 5 μM (■), 20 μM (●), 50 μM (▲), 100 μM (▼) und 400 μM (◆). Es handelt sich um normierte und gemittelte Werte von 5-11 Oozyten \pm SEM. Normiert wurde auf den Strom in Gegenwart bei -100 mV in Gegenwart von 400 μM GABA in Abwesenheit von NA.

Abbildung (B) zeigt den mGAT1-vermittelten Strom bei -20 mV in Abhängigkeit der GABA-Konzentration in Abwesenheit und Anwesenheit von 100 μM NA. Die roten Linien sind Kurvenanpassungen nach Michaelis-Menten (Gleichung 6). (Parameter: siehe Text, Tabelle 4.3.1)

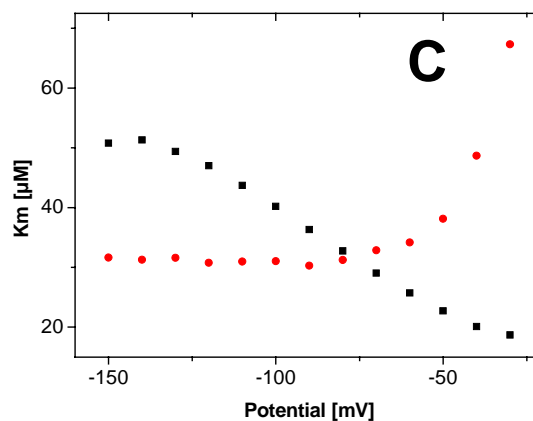


Abbildung (C) zeigt die Spannungsabhängigkeit der apparenten K_m -Werte von GABA in Abwesenheit von NA (■) und in Anwesenheit von 100 μM NA (●) am mGAT1. Die K_m -Werte wurden erhalten durch Kurvenanpassung nach Michaelis-Menten (Gleichung 6) an die Daten aus Abbildung A.

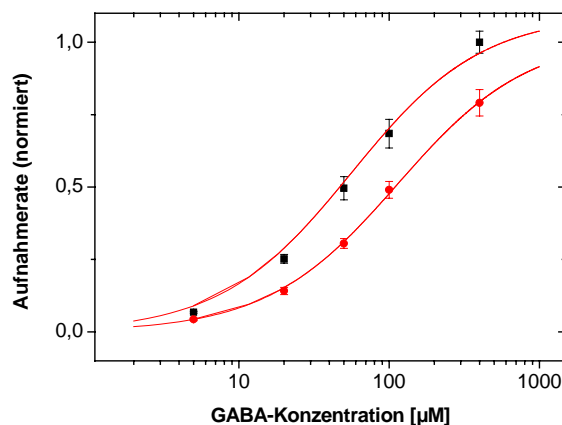
In Gegenwart von 100 μM NA konnte durch Registrierung GABA-abhängiger IV-Kurven nicht geklärt werden, ob NA den mGAT1-vermittelten Strom kompetitiv, nicht kompetitiv oder unkompetitiv inhibiert (Abbildung 4.2.3). Zwar zeigt sich eine deutliche Regulation des K_m -Wertes für GABA in Anwesenheit von 100 μM NA (Abbildung 4.2.3C), jedoch scheint der durch GABA hervorgerufene Strom in Gegenwart von 100 μM NA spannungsunabhängig bei 20 %-30% des durch GABA

allein hervorgerufenen Stroms zu sättigen. Exemplarisch ist in Abbildung 4.2.3B die GABA-Konzentrationsabhängigkeit des mGAT1-vermittelten Stroms bei -20 mV ohne und mit $100\text{ }\mu\text{M}$ NA dargestellt. (Da das Ruhepotential einer mGAT-exprimierten Zelle in Gegenwart von $400\text{ }\mu\text{M}$ GABA zwischen 0 und -20 mV liegt, wurden zur Vergleichbarkeit mit ^3H -GABA-Aufnahmemessungen alle Konzentrationsabhängigkeiten bei -20 mV dargestellt.)

Da NA einen eigenen mGAT1-vermittelten Strom verursacht, ist die Analyse der transienten Ströme nicht sinnvoll. In Gegenwart von NA würde eine Kombination aus transientem Strom und aus dem durch NA hervorgerufenen mGAT1-vermittelten Strom analysiert.

Der mGAT1-vermittelte Transport scheint kompetitiv inhibiert zu sein (Abbildung 4.2.4). Der durch Kurvenanpassung nach Michaelis-Menten (Gleichung 6) ermittelte Maximaltransport in Abwesenheit von NA ist um 7% größer, als der in Anwesenheit von $100\text{ }\mu\text{M}$ NA ermittelte Maximaltransport. Der apparente K_m -Wert für die GABA-Aufnahme verdoppelt sich von $62\text{ }\mu\text{M}$ in Abwesenheit von NA auf $114\text{ }\mu\text{M}$ in Gegenwart von $100\text{ }\mu\text{M}$ NA.

Abbildung 4.2.4



Die Abbildung zeigt die GABA-Abhängigkeit der GABA-Aufnahmerate in Abwesenheit (■) und Anwesenheit (●) von $100\text{ }\mu\text{M}$ NA. Es handelt sich um normierte und gemittelte Meßwerte von 20 Oozyten \pm SEM. Normiert wurde auf die GABA-Aufnahmerate bei $400\text{ }\mu\text{M}$ GABA in Abwesenheit von NA. Die roten Linien stellen Kurvenanpassungen nach Michaelis-Menten (Gleichung 6) dar. (Parameter: siehe Text, Tabelle 4.3.1)

4.2.2 Promethazin

Auch die zweite untersuchte Substanz, PMZ, inhibiert den durch 400 μM GABA hervorgerufenen mGAT1-vermittelten Strom konzentrationsabhängig (Abbildung 4.2.5). Da nicht gezeigt werden konnte, ob PMZ den mGAT1-vermittelten Strom kompetitive, nicht kompetitiv oder unkompetitiv inhibiert, wurden ausschließlich zur Abschätzung der IC_{50} -Werte abfallende e-Funktionen erster Ordnung (siehe Gleichung 7, Kapitel 8.2) an die gemessenen Werte der PMZ-Konzentrationsabhängigkeiten angepaßt (Abbildung 4.2.5B).

Der so abgeschätzte IC_{50} -Wert für PMZ liegt für den mGAT1-vermittelten Strom unabhängig von der Spannung bei ca. 750 μM . Um bei ^3H -GABA-Aufnahmemessungen eine halbmaximale Inhibition zu erreichen, mußte eine Konzentration von 790 μM PMZ appliziert werden (Abbildung 4.2.5B). Nach der Messung der mGAT1-vermittelten Ströme in Abhängigkeit der vier PMZ-Konzentrationen wurde die Oozyte für 5 min mit Ba-ORi gewaschen. Nach dieser Auswaschphase erreichte der durch 400 μM GABA hervorgerufene mGAT1-vermittelte Strom in Abwesenheit von PMZ nur noch das Niveau der Strommessung in Gegenwart von 1000 μM PMZ. Die Tatsache, daß PMZ nicht ausgewaschen werden kann, ist als Grund für die großen Fehlerbalken anzusehen; eine statistisch signifikante Inhibition des mGAT1-vermittelten Stroms bei -60 mV ist erst ab einer PMZ-Konzentration von 500 μM erreicht.

Abbildung 4.2.5

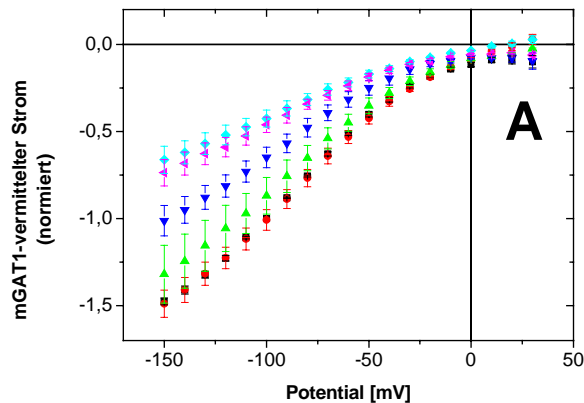


Abbildung (A) zeigt die IV-Kurven in Gegenwart von 400 μM GABA bei PMZ-Konzentrationen von 0 μM (■), 100 μM (●), 250 μM (▲), 500 μM (▼) und 1000 μM (◆). (◆) zeigt die IV-Kurve bei 400 μM GABA ohne PMZ nach einer Auswaschphase von 5 Minuten. Es handelt sich um normierte und gemittelte Meßwerte von 4 Oozyten \pm SEM. Normiert wurde auf den Strom bei -100 mV in Gegenwart von 400 μM GABA in Abwesenheit von PMZ.

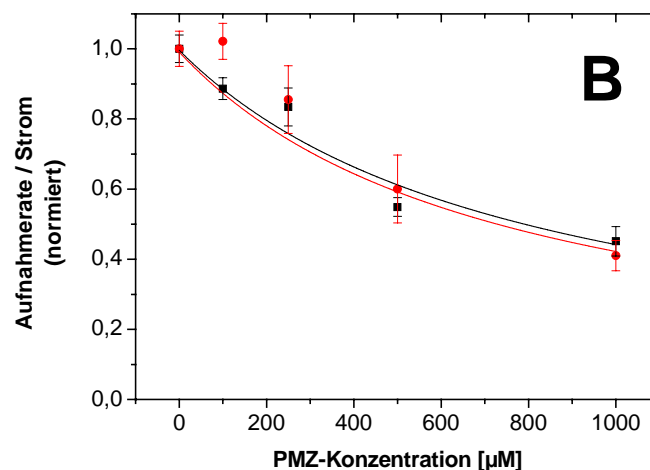


Abbildung (B) zeigt die ^3H -GABA-Aufnahme (■) und den Strom bei -20 mV (●) in Abhängigkeit der PMZ-Konzentration. Die Werte des Stroms wurden aus Abbildung A entnommen und bei einer PMZ-Konzentration von 0 μM auf 1 normiert; die Werte der Aufnahme sind normierte und gemittelte Meßwerte von 30 Oozyten \pm SEM. Normiert wurde auf die GABA-Aufnahmerate in Abwesenheit von PMZ. Die Linien sind Kurvenanpassungen nach Gleichung 7. (siehe Text, Tabelle 4.3.1)

Die transienten Ströme konnten aufgrund der geringen Zahl gemessener Oozyten nur hinsichtlich der verschobenen Ladung analysiert werden (Abbildung 4.2.6). Q_{total} wird in Abhängigkeit der PMZ-Konzentration reduziert. Im Gegensatz zum mGAT1-vermittelten Strom (Abbildung 4.2.5) ist eine Auswaschung dieses Effekts teilweise möglich (Ladungsverschiebung und mGAT1-vermittelte Ströme wurden an denselben

Oozyten gemessen). Die Na^+ -Affinität, repräsentiert durch den $E_{1/2}$ -Wert, scheint mit steigender PMZ-Konzentration erhöht zu sein. Der in der Tabelle in Abbildung 4.2.6 gezeigten Änderung der effektiven Valenzen z_F ist aufgrund der großen Fehlerbalken in den QV-Kurven keine Bedeutung beizumessen.

Abbildung 4.2.6

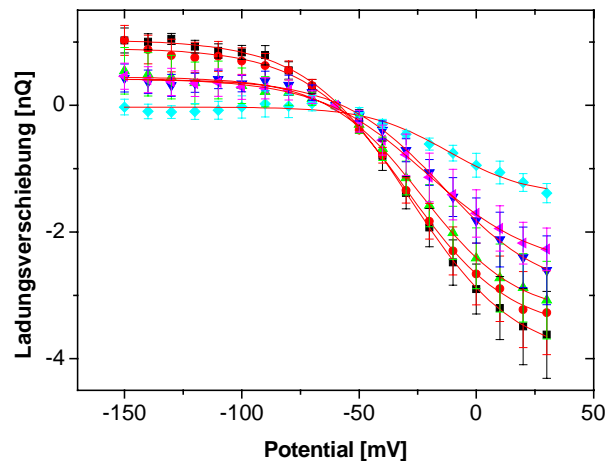


Abbildung (A) zeigt die QV-Kurven bei PMZ-Konzentrationen von 0 μM (■), 100 μM (●), 250 μM (▲), 500 μM (▼) und 1000 μM (◆). (◆) zeigt die QV-Kurve nach einer PMZ-freien Auswaschphase von 5 Minuten. Es handelt sich um nicht normierte Mittelwerte von 4 Oozyten \pm SEM. Die roten Linien sind Kurvenanpassungen nach Fermi (Gleichung 2). Die durch die Anpassung erhaltenen Parameter sind in folgender Tabelle gezeigt:

PMZ-Koncentration [μM]	$E_{1/2}$ [mV]	z_F	Q_{total} [nC]
0	-28,1	0,9	5,03
100	-29,8	0,9	4,47
250	-23,1	0,8	3,77
500	-14,3	0,9	3,4
1000	-12,2	0,7	1,4
0 (Auswaschphase)	-21,4	0,9	2,98

In Gegenwart von 500 μM PMZ konnte durch Registrierung GABA-abhängiger IV-Kurven nicht geklärt werden, in welcher Weise PMZ den mGAT1-vermittelten Strom inhibiert (Abbildung 4.2.7). Es zeigte sich eine deutliche spannungsabhängige Reduktion des K_m -Wertes für GABA in Anwesenheit von 500 μM PMZ (Abbildung 4.2.7C); der mGAT1-vermittelte Strom scheint in Anwesenheit von 500 μM PMZ unabhängig von der Spannung bei 25 % des mGAT1-vermittelten Stroms in

Abwesenheit von PMZ zu sättigen. Exemplarisch ist in Abbildung 4.2.7B die GABA-Konzentrationsabhängigkeit des mGAT1-vermittelten Stroms bei -20 mV ohne und mit $500 \mu\text{M}$ PMZ dargestellt.

Abbildung 4.2.7

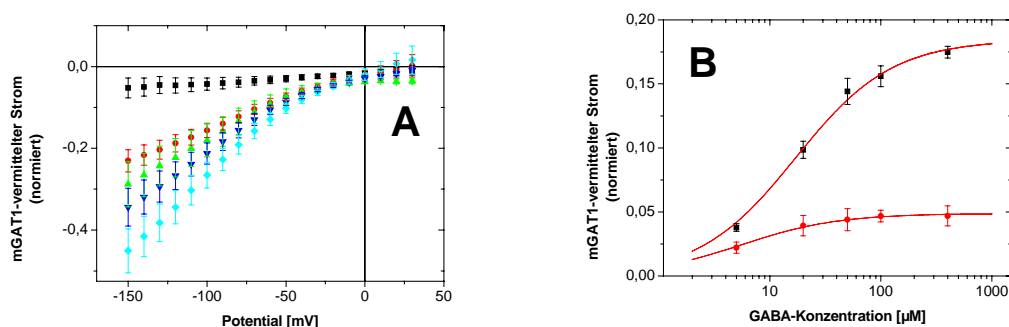


Abbildung (A) zeigt die IV-Kurven in Gegenwart von $500 \mu\text{M}$ PMZ bei GABA-Konzentrationen von $5 \mu\text{M}$ (■), $20 \mu\text{M}$ (●), $50 \mu\text{M}$ (▲), $100 \mu\text{M}$ (▼) und $400 \mu\text{M}$ (◆). Es handelt sich um normierte und gemittelte Meßwerte von 6-11 Oozyten \pm SEM. Normiert wurde auf den Strom bei -100 mV in Gegenwart von $400 \mu\text{M}$ GABA in Abwesenheit von PMZ.

Abbildung (B) zeigt den mGAT1-vermittelten Strom bei -20 mV in Abhängigkeit der GABA-Konzentration in Abwesenheit (■) und Anwesenheit von $500 \mu\text{M}$ PMZ (●). Die Roten Linien sind Kurvenanpassungen nach Michaelis-Menten (Gleichung 6). (Parameter: siehe Text, Tabelle 4.3.1)

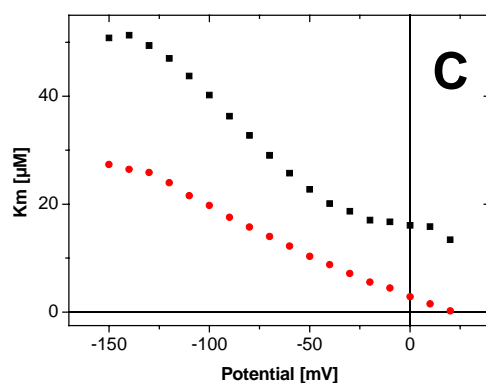
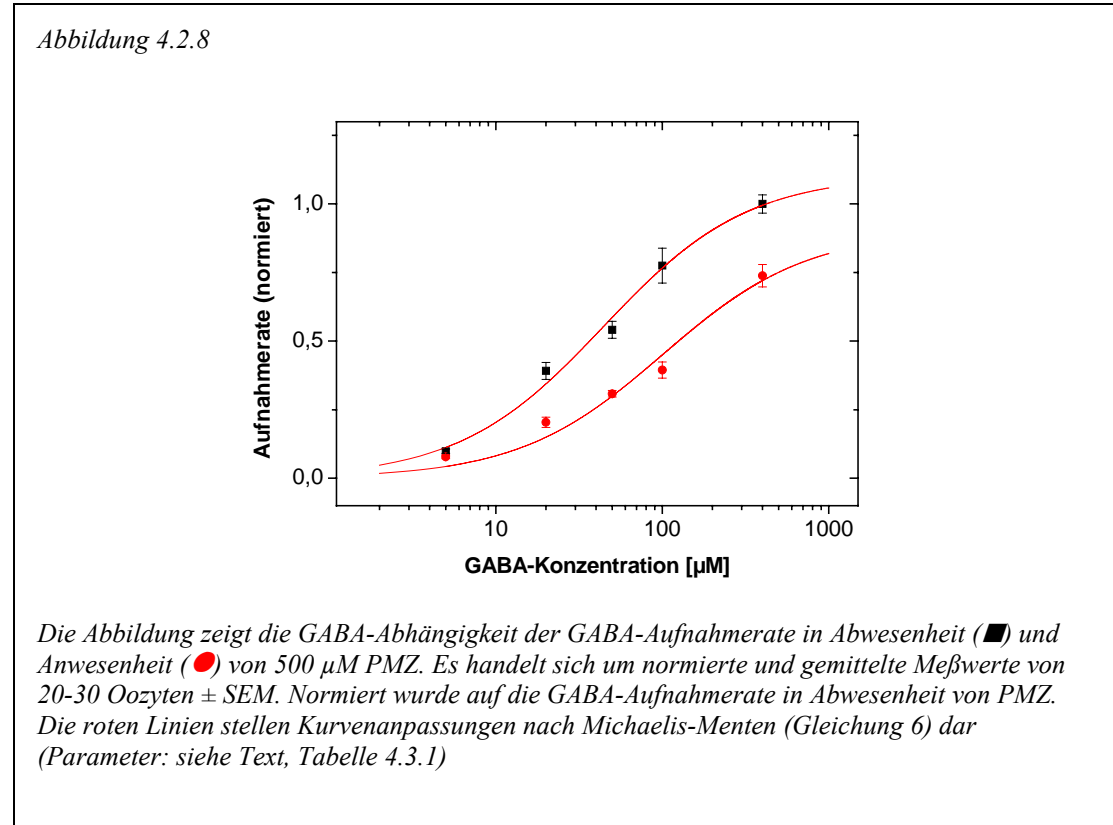


Abbildung (C) zeigt die Spannungsabhängigkeit der nach Michaelis-Menten (Gleichung 6) aus Abbildung A ermittelten K_m -Werte für GABA in Abwesenheit (■) und Anwesenheit (●) von $500 \mu\text{M}$ PMZ.

Auch für den GABA-Transport kann der Mechanismus der PMZ-abhängigen Inhibition nicht geklärt werden (Abbildung 4.2.8). Die durch Kurvenanpassung nach Michaelis-Menten (Gleichung 6) berechnete maximale Transportrate in Abwesenheit von PMZ ist um 20% größer als die in Anwesenheit von $500 \mu\text{M}$ PMZ berechnete

maximale Transportrate; der K_m -Wert für die GABA-Aufnahme verdoppelt sich von 62 μM in Abwesenheit von PMZ auf 100 μM in Gegenwart von 100 μM PMZ (Abbildung 4.2.8).



4.2.3 SKF-89976-A

Der durch 400 μM GABA hervorgerufene mGAT1-vermittelte Strom wird in Abhängigkeit der SKF-Konzentration inhibiert (Abbildung 4.2.9A). Unter der Annahme, daß es sich bei SKF um einen kompetitiven Inhibitor des mGAT1-vermittelten Stroms handelt, konnten Kurven nach Gleichung 8 an die Meßergebnisse aus Abbildung 4.2.9A angepaßt werden. Gleichung 8 stellt die Summe zweier äquivalenter Gleichungen dar, die jeweils eine kompetitive Inhibition beschreiben. Kurvenanpassung nach Gleichung 5 war nicht möglich.

$$\text{Gleichung 8} \quad I = I_{\max}^{\text{transp}} \frac{\frac{[GABA]}{K_m^{\text{transp}}}}{1 + \frac{[GABA]}{K_m^{\text{transp}}} + \frac{[SKF]}{K_I^{\text{transp}}}} + I_{\max}^{\text{trans-ass}} \frac{\frac{[GABA]}{K_m^{\text{trans-ass}}}}{1 + \frac{[GABA]}{K_m^{\text{trans-ass}}} + \frac{[SKF]}{K_I^{\text{trans}}}}$$

Daß der Strom durch einen kompetitiven Mechanismus inhibiert wird, kann zwar nicht mit Sicherheit gezeigt werden, doch legt die Strukturanalogie zu GABA einen kompetitiven Inhibierungsmechanismus nahe (Abbildung 4.1.1, im Verlauf der Ergebnisse wird gezeigt, daß die Annahme einer kompetitiven Inhibition korrekt ist; weitere Erklärung: siehe Diskussion).

Abbildung 4.2.9

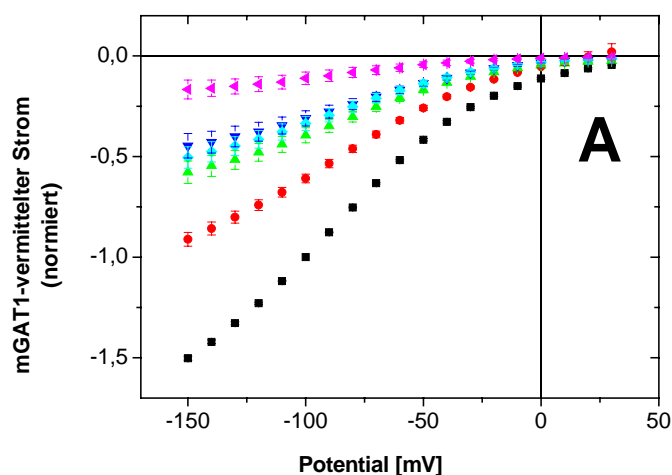


Abbildung (A) zeigt die IV-Kurven in Gegenwart von 400 μM GABA bei SKF-Konzentrationen von 0 μM (■), 1 μM (●), 2 μM (▲), 5 μM (▼), 10 μM (◆) und 100 μM (◀). Es handelt sich um normierte und gemittelte Meßwerte von 3-8 Oozyten \pm SEM. Normiert wurde auf den Strom bei -100 mV in Gegenwart von 400 μM GABA in Abwesenheit von SKF.

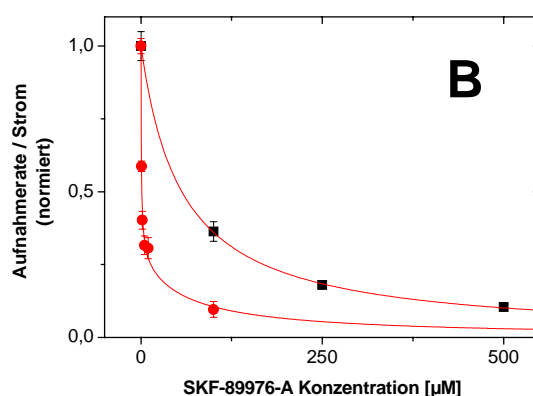
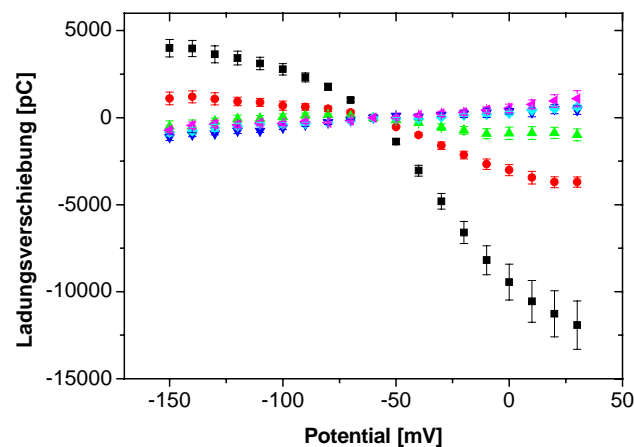


Abbildung (B) zeigt die ^3H -GABA-Aufnahme (■) und den mGAT1-vermittelten Strom bei -20 mV (●) in Abhängigkeit der SKF-Konzentration. Die Werte des Stroms wurden aus Abbildung A entnommen und bei einer SKF-Konzentration von 0 μM auf 1 normiert; die Werte der Aufnahme sind normierte und gemittelte Meßwerte von 30 Oozyten \pm SEM. Normiert wurde auf die GABA-Aufnahmerate in Abwesenheit von SKF. Die rote Linie ist im Fall der Aufnahme eine Kurvenanpassung nach Gleichung 5, im Fall des Stroms eine Kurvenanpassung nach Gleichung 8. (Parameter: siehe Text, Tabelle 4.3.1)

Die Parameter der beiden unabhängigen Summanden aus Gleichung 8 beschreiben jeweils die Eigenschaften des Transportstroms sowie des Transporter-assoziierten Stroms. Danach liegt der K_I -Wert für SKF für den Transportstrom spannungsunabhängig bei $7,5 \mu\text{M}$; der K_I -Wert für SKF für den Transporter-assoziierten Strom liegt spannungsunabhängig bei $0,03 \mu\text{M}$. Die Meßergebnisse der SKF-abhängigen GABA-Aufnahme lassen sich mit Gleichung 5 beschreiben. In diesem Fall liegt der K_I -Wert für SKF für die GABA-Aufnahme bei $6,3 \mu\text{M}$ (Abbildung 4.2.9B).

Abbildung 4.2.10



Die Abbildung zeigt die QV-Kurven bei SKF-Konzentrationen von $0 \mu\text{M}$ (■), $1 \mu\text{M}$ (●), $2 \mu\text{M}$ (▲), $5 \mu\text{M}$ (▼), $10 \mu\text{M}$ (◆) und $100 \mu\text{M}$ (◆). Es handelt sich um nicht normierte Mittelwerte von 3-8 Oozyten \pm SEM. Die Parameter einer Kurvenanpassung nach Fermi (Gleichung 2) für die SKF-Konzentrationen $0 \mu\text{M}$ und $1 \mu\text{M}$ sind in folgender Tabelle dargestellt:

SKF-Konzentration [μM]	$EI_{1/2}$ [mV]	z_F	Q_{total} [pC]
0	-30,7	1	17327
1	-30,9	0,94	5271

Die transienten Ströme werden durch SKF hinsichtlich der Ladungsverschiebung stärker reduziert als die mGAT1-vermittelten Steady-State-Ströme (Abbildung 4.2.10). An die QV-Kurven sind nur bei 0 und $1 \mu\text{M}$ SKF Kurvenanpassungen nach Fermi (Gleichung 2) möglich, bei höheren SKF-Konzentrationen ist das gemessene Signal bereits so klein, daß keine sigmoide Kurve mehr erkennbar ist. Bei $1 \mu\text{M}$ SKF ist Q_{total} schon auf ein Drittel des Ausgangswertes reduziert; die Na^+ -Affinität,

repräsentiert durch $E_{1/2}$, und die effektive Valenz z_F scheinen jedoch nicht reguliert zu sein.

Die Analyse der Raten war durch den extrem reduzierten transienten Strom nicht zuverlässig möglich. Es liegen jedoch keine Anzeichen für eine Regulation der Na^+ -Bindungsrate in Gegenwart von SKF vor (keine Abbildung).

In Gegenwart von 25 μM SKF konnte durch Registrierung GABA-abhängiger IV-Kurven nicht eindeutig geklärt werden, ob SKF den mGAT1-vermittelten Strom kompetitiv, nicht kompetitiv oder unkompetitiv inhibiert (Abbildung 4.2.11B). Zwar

Abbildung 4.2.11

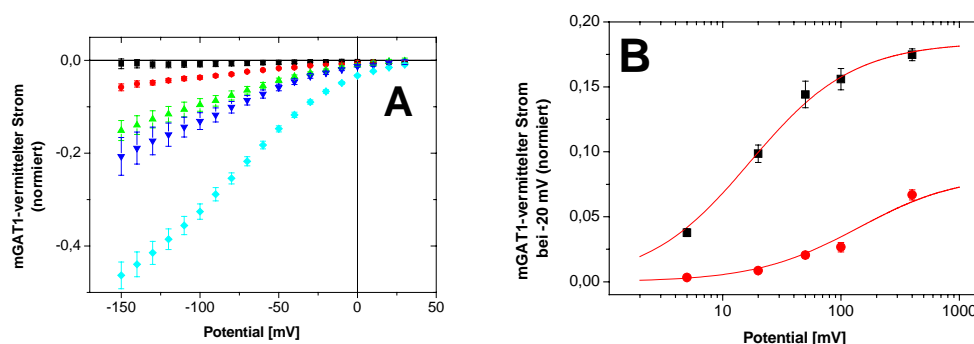


Abbildung (A) zeigt die IV-Kurven in Gegenwart von 25 μM SKF bei GABA-Konzentrationen von 5 μM (■), 20 μM (●), 50 μM (▲), 100 μM (▼) und 400 μM (◆). Es handelt sich um normierte und gemittelte Meßwerte von 5-10 Oozyten \pm SEM. Normiert wurde auf den Strom bei -100 mV bei 400 μM GABA in Abwesenheit von SKF.

Abbildung (B) zeigt exemplarisch die GABA-Konzentrationsabhängigkeit der mGAT1-vermittelten Ströme bei -20 mV in Anwesenheit von 400 μM GABA ohne (■) und mit 25 μM SKF (●). Es handelt sich um normierte und gemittelte Werte von 5 – 10 Oozyten \pm SEM. Die roten Linien stellen Kurvenanpassungen nach Michaelis-Menten (Gleichung 6) dar. (Parameter siehe Text, Tabelle 4.3.1)

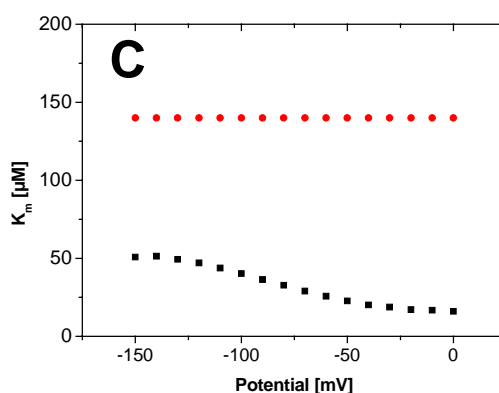
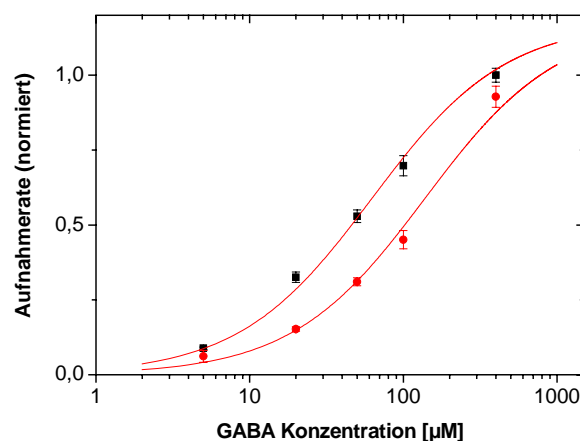


Abbildung (C) zeigt die Spannungsabhängigkeit der nach Michaelis-Menten aus Abbildung A ermittelten K_m -Werte für GABA in Abwesenheit (■) und Anwesenheit (●) von 25 μM SKF

zeigt sich in Anwesenheit von 25 μM SKF eine Vergrößerung des K_m -Wertes für GABA (Abbildung 4.2.11 C), jedoch scheint der durch GABA hervorgerufene Strom in Gegenwart von 25 μM SKF bei 25 % - 30 % des durch GABA allein hervorgerufenen Stroms zu sättigen (nach Kurvenanpassung nach Michaelis-Menten (Gleichung 6)). In Gegenwart von nur 0,5 μM SKF jedoch zeigt sich mit steigenden GABA-Konzentrationen eindeutig, daß sich der entsprechende I_{max} -Wert dem I_{max} -Wert in Abwesenheit von SKF annähert (keine Abbildung), was eine kompetitive Hemmung anzeigt.

Die ^3H -GABA-Aufnahme scheint durch SKF kompetitiv inhibiert zu sein (Abbildung 4.2.12). Der K_m -Wert für GABA für die GABA-Aufnahme liegt in Abwesenheit von SKF bei 62 μM und steigt in Anwesenheit von 25 μM SKF auf 138 μM .

Abbildung 4.2.12

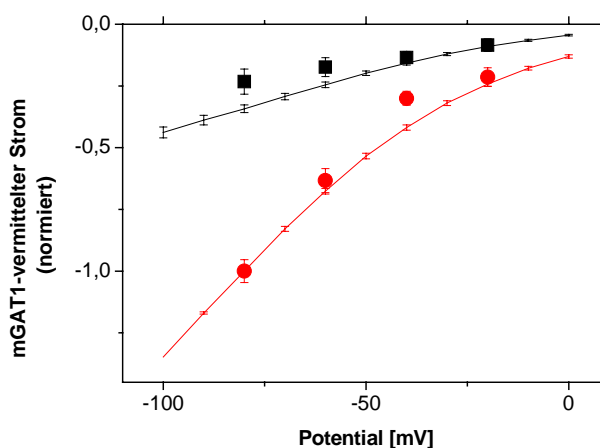


Die Abbildung stellt die GABA-Aufnahmerate in Abhängigkeit der GABA-Konzentration ohne (■) und mit 25 μM SKF (●) dar. Es handelt sich um die normierten und gemittelten Werte von 16-58 Oozyten \pm SEM. Normiert wurde auf die GABA-Aufnahmerate bei 400 μM GABA in Abwesenheit von SKF. Die Aufnahmeraten bei 400 μM GABA mit 25 μM SKF und ohne 25 μM SKF unterscheiden sich nicht signifikant. Die roten Linien stellen Kurvenanpassungen nach Michaelis-Menten (Gleichung 6) dar. (Parameter: siehe Text, Tabelle 4.3.1)

Führt man ^3H -GABA-Aufnahmemessungen unter Spannungsklemme durch, kann man den Strom messen und unter der Voraussetzung, daß pro Transportzyklus eine positive Ladung die Zellmembran passiert, den Strom auch aus der Aufnahmerate berechnen (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.4.4). Der unter dieser Annahme berechnete Strom ist im Spannungsbereich von -20 bis -80 mV drei- bis fünfmal

kleiner als der gemessene Strom (Abbildung 4.2.13). In dieser Abbildung sind die ^3H -GABA-Aufnahmemessungen unter Spannungsklemme und die IV-Kurve des mGAT1-vermittelten Stroms in Gegenwart von 25 μM SKF überlagert. Die Resultate beider Experimente wurden bei -80 mV des gemessenen mGAT1-vermittelten Stroms in Abwesenheit von SKF normiert. Die berechneten Ströme und die mGAT1-vermittelten Ströme bei 25 μM SKF zeigen im Bereich von -20 mV bis -80 mV keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 4.2.13



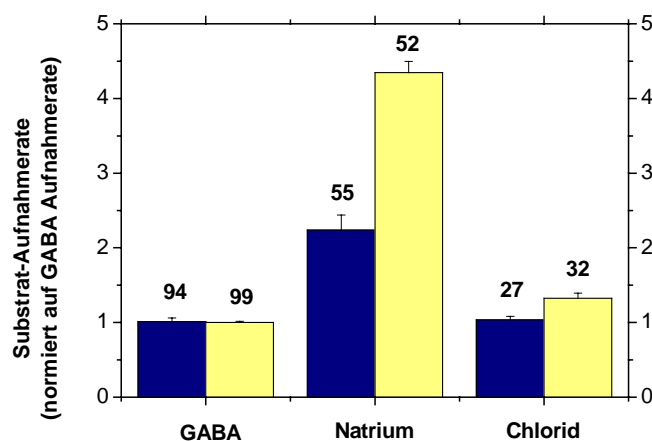
Die Abbildung zeigt die IV-Kurven zweier Experimente. Gezeigt wird der gemessene Strom (●) und der berechnete Strom (■) aus GABA-Aufnahmeexperimenten unter Spannungsklemme. Berechnet wurde der Strom unter der Voraussetzung, daß pro Transportzyklus 1 GABA, 2Na^+ und 1Cl^- die Membran passieren. Es handelt sich um normierte Mittelwerte aus je 5 Oozyten \pm SEM. Die rote Linie zeigt die IV-Kurve in Gegenwart von 400 μM GABA, die schwarze Linie die IV-Kurve in Gegenwart von 400 μM GABA und 25 μM SKF. Es handelt sich um normierte und gemittelte Werte von 28 Oozyten \pm SEM. Alle Kurven wurden auf den gemessenen Strom bei -80 mV in Gegenwart von 400 μM GABA normiert.

Die Tatsache, daß berechneter und gemessener Strom aus Abbildung 4.2.13 sich um den Faktor 3-5 unterscheiden, sowie die unterschiedlichen K_m -Werte für den mGAT1-vermittelten Strom ($K_m = 17\text{ }\mu\text{M}$) und die GABA-Aufnahme ($K_m = 62\text{ }\mu\text{M}$), legen nahe, daß sich der mGAT1-vermittelte Strom aus zwei Komponenten zusammensetzt, einem Transportstrom und einem Transporter-assoziierten Strom.

Da bei einer Kombination von 400 μM GABA und 25 μM SKF offensichtlich die eine Stromkomponente, der Transporter-assoziierte Strom, blockiert ist (siehe Abbildung 4.2.13 und Diskussion), der Transport sich aber nicht signifikant ändert (Abbildung 4.2.12), bietet diese Kombination sich an, die Stromkomponenten einzeln zu untersuchen. Dazu wurde die Aufnahme rate der radioaktiv markierten Substrate

$^{22}\text{Na}^+$, ^3H -GABA und $^{36}\text{Cl}^-$ bei 400 μM GABA in Abwesenheit und Anwesenheit von 25 μM SKF gemessen (Abbildung 4.2.14). Dabei zeigten die Aufnahmeraten von ^3H -GABA, $^{22}\text{Na}^+$ und $^{36}\text{Cl}^-$ in Anwesenheit von 25 μM SKF ein Verhältnis von 1 : 2,2 : 1, was die angenommene Stöchiometrie von 1GABA : 2 Na^+ : 1 Cl^- bestätigt (siehe Einleitung); GABA- und Cl^- -Aufnahmerate wurden durch 25 μM SKF nicht reguliert; in Abwesenheit von SKF war die Na^+ -Aufnahmerate doppelt so groß wie in Anwesenheit von 25 μM SKF. Ein mGAT1-vermittelter Auswärtstransport von Na^+ oder Cl^- konnte nicht gemessen werden (keine Abbildung). Da weder ein Einstrom von $^{86}\text{Rb}^+$ gemessen werden konnte (Abbildung 4.2.14 Tabelle) noch eine Ca^{2+} -Leitfähigkeit am mGAT1 bekannt ist, kann man von einer Na^+ -selektiven Leitfähigkeit sprechen.

Abbildung 4.2.14

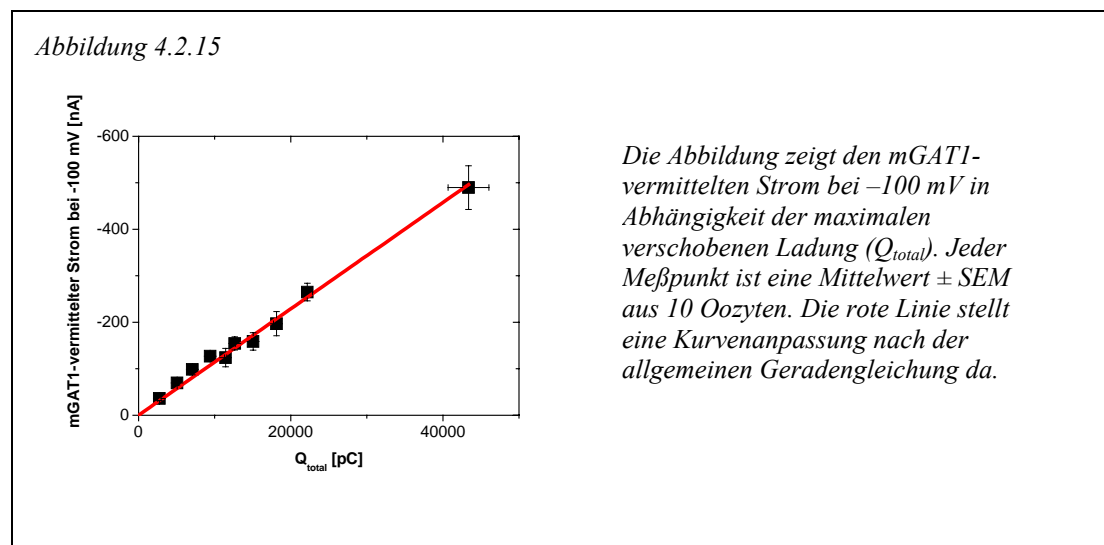


Die Abbildung zeigt die ^3H -GABA, ^{22}Na und ^{36}Cl -Aufnahme. Die gelben Balken zeigen die Aufnahme bei 400 μM GABA. Die blauen Balken zeigen die Aufnahme bei 400 μM GABA in Anwesenheit von 25 μM SKF. Gezeigt sind normierte und gemittelte Werte \pm SEM. Die Zahlen über den Balken zeigen jeweils die Zahl der gemessenen Oozyten an. Normiert wurde die Aufnahme jedes Substrates auf die GABA-Aufnahme in Abwesenheit von SKF. Folgende Tabelle zeigt die Absolutwerte der gemessenen Aufnahmerate in [fMol/s]:

	400 μM GABA 25 μM SKF	400 μM GABA
^3H -GABA	249 \pm 12,5	247 \pm 3
$^{22}\text{Na}^+$	550 \pm 49	1072 \pm 34,6
$^{36}\text{Cl}^-$	254 \pm 11,33	326 \pm 16,7
$^{86}\text{Rb}^+$	28,5 \pm 3,7	21,9 \pm 3

Eine vom Überexpressionssystem Oozyte abhängige Bildung von Poren durch eine Zusammenlagerung mehrerer Transportproteine, wie für den EAAC1 beschrieben

(Eskandari S. et al., 2000), konnte ausgeschlossen werden. Eine aus einer solchen Zusammenlagerung zu erwartende überproportional verstärkte Leitfähigkeit des mGAT1 konnte nicht gezeigt werden (Abbildung 4.2.15). Der mGAT1-vermittelte Strom steigt linear mit den Grad der Expression, hier dargestellt als Q_{total} . Würde das Überexpressionssystem durch Zusammenlagerung von mehreren GABA-Transportern ein Pore bilden und eine erhöhte Leitfähigkeit verursachen, sollte die dargestellten Kurve eine Stufe oder zumindest eine zunehmende Steigung aufweisen.



Nicht nur bei SKF oder NA konnte der Effekt der unterschiedlich starken Hemmung von mGAT1-vermitteltem Strom und GABA-Transport beobachtet werden. Auch die mit SKF strukturell nicht verwandte Substanz Okadaic Acid zeigte in einer Konzentration von $0,1\text{ }\mu\text{M}$ eine Diskrepanz zwischen der Hemmung des Transports (Inhibition auf 73%) und des mGAT1-vermittelten Stroms bei -20 mV (Inhibition auf 10%). Zwar liegen für den inhibierenden Effekt von Okadaic Acid keine systematischen Messungen vor. Doch zeigt der Vergleich von mGAT1-vermitteltem Strom und GABA-Aufnahmerate in Gegenwart von $0,1\text{ }\mu\text{M}$ Okadaic acid, daß auch Substanzen, die strukturell nicht mit NA oder SKF verwandt sind, den mGAT1-vermittelten Strom und die GABA-Aufnahme unterschiedlich stark inhibieren können (Abbildung 4.2.16).

Abbildung 4.2.16

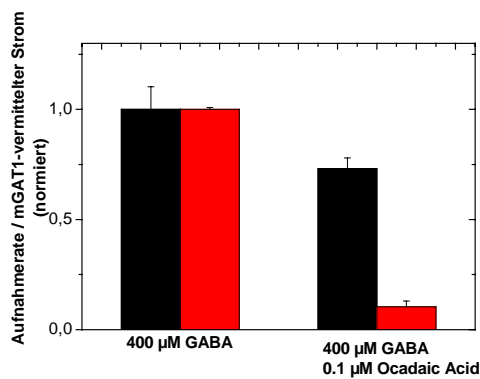


Abbildung 16 zeigt den Vergleich zwischen GABA-Aufnahmerate und mGAT1-vermittelten Strom bei -20 mV in Anwesenheit und Abwesenheit von $0,1$ μ M Ocadaic Acid. Schwarze Balken zeigen die normierten und gemittelten Meßwerte der Aufnahmerate \pm SEM aus 20 Oozyten. Die roten Balken zeigen die normierten und gemittelten Meßwerte des Stroms bei -20 mV \pm SEM aus 4 Oozyten. Normiert wurde auf den Strom bei -100 mV in Gegenwart von 400 μ M GABA in Abwesenheit von OA.

4.3 Diskussion

Zwei Strom-Komponenten

Durch elektrophysiologische Messungen, radioaktive Aufnahmemessungen und mit Hilfe detaillierter Auswertung von Substrat- und Inhibitor-Konzentrationsabhängigkeiten konnte gezeigt werden, daß der mGAT1-vermittelte Strom aus zwei Komponenten zusammengesetzt ist, einem Transportstrom und einem Transporter-assoziierten Strom. Die Tatsachen, daß der nach der Transportstöchiometrie von $1\text{GABA} : 2\text{Na}^+ : 1\text{Cl}^-$ berechnete Strom des mGAT1 drei- bis fünfmal kleiner ist als der gemessene mGAT1-vermittelte Strom und daß sich die apparenten K_m -Werte für die GABA-Aufnahme und den mGAT1-vermittelten Strom um den Faktor drei unterscheiden (Tabelle 4.3.1), legen nahe, daß sich der mGAT1-vermittelte Strom aus mindestens zwei Komponenten zusammensetzt. Diese Schlußfolgerung fügt sich abgesehen vom GLYT1 nahtlos in das Bild der andern Na^+/Cl^- -abhängigen Neurotransmittertransporter ein (siehe Einleitung).

SKF

GABA-Aufnahmemessungen zeigen, daß bei einer Kombination von 400 μ M GABA und 25 μ M SKF der Transport gegenüber dem Transport bei 400 μ M GABA allein nicht signifikant blockiert ist (Abbildung 4.2.12). Der mGAT1-vermittelte Strom

hingegen wird unter diesen Bedingungen, abhängig von der vorgegebenen Spannung um den Faktor drei bis fünf reduziert (signifikant) (Abbildung 4.2.11B). Zwei Tatsachen zeigen, daß die nicht an den Transport gekoppelte Strom-Komponente, der Transporter-assoziierte Strom, in Gegenwart von 25 μM SKF komplett blockiert wird: Zum einen lassen sich die IV-Kurve des berechneten Stroms mit der gemessenen IV-Kurve in Gegenwart von 25 μM SKF ohne signifikanten Unterschied überlagern (Abbildung 4.2.13). Zum anderen zeigt sich bei Messungen in Gegenwart von 25 μM SKF kein Unterschied zwischen den K_m -Werten für GABA-Aufnahme (138 μM) und mGAT1-vermittelten Strom (140 μM) (Tabelle 4.3.1). Das heißt, der komplette in Gegenwart von 400 μM GABA und 25 μM SKF gemessene Strom entspricht dem Transport.

Eine kompetitive Inhibition

Die Inhibition des mGAT1 durch SKF scheint sowohl im Transport als auch im Strom durch einen kompetitiven Mechanismus vermittelt zu sein. Die GABA-Konzentrationsabhängigkeit bei GABA-Aufnahmemessungen zeigt klar eine kompetitive Inhibition an (Abbildung 4.2.12). Der mGAT1-vermittelte Strom jedoch wird auch bei GABA-Konzentrationen von bis zu 4000 μM unter Einwirkung von 25 μM SKF um ca. 60 % reduziert (Daten nicht gezeigt). Das scheint auf den ersten Blick widersprüchlich zu sein, jedoch sprechen drei Aspekte dafür, daß es sich auch im Fall des mGAT1-vermittelten Stroms um eine kompetitive Inhibition handelt.

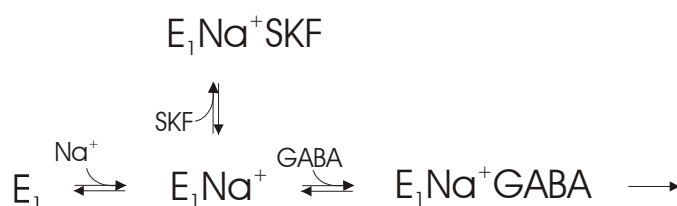
(I) Zum einen müßte bei einem K_i -Wert von 0,03 μM SKF für den Transporter-assoziierten Strom eine GABA-Konzentration von 15200 μM eingesetzt werden um eine Halbmaximale Aktivierung des Stroms zu erhalten (berechnet nach Gleichung 5); geht man davon aus, daß schon bei fünffacher K_m -Konzentration eine Sättigungskonzentration erreicht ist, müßten ca. 75 mM GABA eingesetzt werden, um in Gegenwart von 25 μM SKF I_{\max} zu erreichen. Das heißt, daß bei einer SKF Konzentration von 25 μM eine kompetitive Inhibition nicht nachweisbar ist; das schließt jedoch den Mechanismus der kompetitiven Hemmung nicht aus.

Zum anderen zeigen GABA-abhängige Messungen des mGAT1-vermittelten Stroms bei niedrigeren SKF-Konzentrationen einen kompetitiven Inhibitionsmechanismus an. In Gegenwart von 0,5 μM SKF wird deutlich, daß sich der mGAT1-vermittelte Strom bei hohen GABA-Konzentrationen dem I_{\max} in Abwesenheit von SKF nähert.

(II) Der zweite Aspekt, der ausdrücklich für eine kompetitive Inhibition spricht, ergibt sich über eine strukturelle Betrachtung von SKF sowie eine funktionelle Betrachtung seiner beiden Struktur motive (Abbildung 4.1.1). SKF besteht strukturell gesehen aus NA, an die über eine 3 C-Atome langen Abstandhalter ein planares, aromatisches Ringsystem gebunden ist. In dieser Arbeit wurde der inhibitorische Effekt der beiden Struktur motive am mGAT1 einzeln, in Form von NA selbst und in Form von PMZ, eines Analogons des planaren Ringsystems, untersucht. Obwohl NA im eigentlichen Sinne nicht als GABA-Analogen zu beschreiben ist, kann man aus pharmakologischer Sicht von einer GABA-analogen Struktur sprechen. Das rührt daher, daß GABA durch die freie Drehbarkeit seiner drei C-C-Einfachbindungen den gleichen Abstand zwischen Aminogruppe und Carboxylgruppe herstellen kann, wie er in der fixierten Konformation der NA vorliegt. So verwundert es auch nicht, daß NA GABA-typische Eigenschaften zeigt. NA generiert in Abwesenheit von GABA einen Strom am mGAT1 (Abbildung 4.2.2A), der sicherlich zu einem Teil durch die Transportierbarkeit der NA erklärbar ist (Kanner B., 1983); außerdem ist die Spannungsabhängigkeit der K_m -Werte dieselbe wie bei GABA (Abbildung 4.2.2B). In der GABA-Abhängigkeit zeigt NA ähnliche Eigenschaften wie SKF selbst. Zwar ist im Transport keine deutliche kompetitive Hemmung sichtbar (Abbildung 4.2.4), der mGAT1-vermittelte Strom aber wird wie bei SKF in deutlich größerem Ausmaß reduziert als der Transport (Abbildung 4.2.1B). Auch der K_I -Wert der NA ist ähnlich wie bei SKF für den Strom wesentlich niedriger als für den Transport (Tabelle 4.3.1). Allerdings ist im Fall von SKF dieses Verhältnis deutlich ausgeprägter. PMZ hingegen zeigt keine funktionellen Ähnlichkeiten mit SKF (Abbildung 4.2.5 - Abbildung 4.2.8). Auch die anderen in Abbildung 4.1.1 aufgeführten Substanzen zeigen keine funktionelle Ähnlichkeit mit SKF. Zwar ist deren Funktion durch den Mangel an elektrophysiologischen Experimenten nur begrenzt zu beurteilen, doch zeigen schon die IC_{50} -Werte für die einzelnen Substanzen, daß sie sich deutlich von SKF unterscheiden (AMI = 590 μ M, Dox = 720 μ M, FLUOX = 540 μ M, FLUVOX = 840 μ M). Das heißt, das planare Ringsystem des SKF ist nicht das maßgeblich inhibierende Strukturmotiv und damit auch kein für die Familie der Na^+/Cl^- -abhängigen Neurotransmittertransporter allgemeingültiges inhibierendes Strukturmotiv. Die Betrachtungen lassen den Schluß zu, daß die GABA-Analoge Struktur des SKF am mGAT1 bindet und ihn kompetitiv blockiert.

(III) Ein dritter Hinweis auf einen kompetitiven Inhibierungsmechanismus ist die aus der Literatur bekannte Eigenschaft des sogenannten „Lock-in-current“ (Mager S. et al., 1996 ; eigene, nicht gezeigte Ergebnisse). Beim Lock-in-current handelt es sich bei Oozyten um einen transienten Na^+ -abhängigen Strom, der bei einem bestimmten Haltepotential durch schnellen Lösungswechsel von SKF-freier auf SKF-haltige Lösung in Abwesenheit von GABA am GAT1 generiert wird. Dieser transiente Strom entspricht in seiner Größe dem transienten Strom, der durch Spannungspulse von eben dem Haltepotential auf ein negatives Sättigungspotential in Abwesenheit von GABA generiert wird. Das heißt, durch Bindung von SKF in Abwesenheit von GABA wird Na^+ an den Transporter gebunden. Die Tatsache, daß der transiente Strom in Abwesenheit von GABA wesentlich stärker blockiert wird, als der mGAT1-vermittelte Strom in Anwesenheit von GABA (Abbildung 4.2.9, Abbildung 4.2.10), läßt sich nur durch ein kompetitives Bindungsmodell erklären (Abbildung 4.3.1)

Abbildung 4.3.1



Es handelt sich um ein vereinfachtes Modell für die Bindung von GABA und SKF am mGAT1. Die Doppelpfeile symbolisieren Bindung und Dissoziation von Na^+ , GABA, und SKF. Der einfache Pfeil zeigt die Umsetzung des $E_1 \text{Na}^+ \text{GABA}$ -Komplexes an, die als Transport oder Strom gemessen werden kann. Dieses Modell beschreibt sowohl Transport Strom als auch Transporter-assoziierten Strom.

Der große Rest am GABA-Analogon

Die höhere Affinität von SKF gegenüber NA ließe sich mit der Idee erklären, daß SKF durch den großen Rest mit der Carboxylgruppe nach vorn gerichtet in die GABA-Bindungstasche geschoben wird. Offensichtlich ist es auch der große Rest, der SKF zum untransportierbaren Inhibitor macht. Dies wurde bereits am Alanin-Serin-Cystein-Transporter für ähnlich aufgebaute Substanzen beschrieben (Grewer C. et al., 2004). Weitere Unterstützung findet diese Idee in der Tatsache, daß Okadaic Acid in Bezug auf die Hemmung der GABA-Aufnahme und des mGAT1-vermittelten Stroms ähnliche Eigenschaften zeigt wie SKF. Obwohl OA in struktureller und funktioneller

Hinsicht nicht mit SKF verwandt ist, läßt sich doch ein Strukturmotiv beschreiben, das beide Substanzen teilen: SKF und OA haben jeweils eine Carboxylgruppe die über einen Abstandhalter von zwei oder drei C-Atomen an eine Lewis-Base gebunden ist, die wiederum an einen großen Rest gebunden ist (Abbildung 4.1.1). Es besteht also die Möglichkeit, daß für die Hemmung des Transporter-assoziierten Stroms das hier beschriebene Motiv einer Carboxylgruppe mit Abstandhalter, Lewisbase und großem Rest ausreichend ist. Daß dieses Motiv nicht transportierbar ist und keinen eigenen Strom erzeugt, macht es auch erst möglich, SKF als pharmakologisches Werkzeug zu benutzen, um Transportstrom und Transporter-assoziierten Strom zu unterscheiden. Zwar zeigt auch NA deutliche Unterschiede in der Fähigkeit den mGAT1-vermittelten Strom und den GABA-Transport zu blockieren; doch da NA einen eigenen Strom am mGAT1 erzeugt, scheidet es als pharmakologisches Werkzeug zur Detektion von GABA-abhängigem mGAT1-vermittelten Na^+ und Cl^- Transport aus.

Der Transporter-assoziierte Strom

Durch die Kombination von 400 μM GABA und 25 μM SKF konnten nun mit radioaktiven Aufnahmemessungen des Substrates ^3H -GABA sowie der kotransportierten Ionen $^{22}\text{Na}^+$ und $^{36}\text{Cl}^-$ der Transport-Strom und der Transporter-assoziierte Strom beschrieben werden (Abbildung 4.2.14). Es zeigte sich deutlich, daß die bis jetzt nur abgeschätzte Stöchiometrie (siehe Einleitung) des GAT1 tatsächlich 1 GABA: 2Na^+ : 1Cl^- ist. Weiterhin konnte der Transporter-assoziierte Strom als Na^+ - Leitfähigkeit ausgemacht werden. Da weder eine $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme gemessen werden konnte, noch eine Ca^{2+} -Leitfähigkeit am mGAT1 bekannt ist (Fei J., persönliche Kommunikation), ist diese Na^+ -Leitfähigkeit als spezifisch zu betrachten.

Die zwei Konformationen

Der genaue Mechanismus des Transporter-assoziierten Stroms konnte nicht identifiziert werden. Es scheint sich jedoch nicht um eine Zusammenlagerung von Transporter-Molekülen aufgrund des Überexpressionssystems Oozyte zu handeln, wie für den EAAC1 beschrieben (Eskandari S. et al., 2000). Andernfalls sollte in Abbildung 4.2.15 bei einer bestimmten Grenzkonzentration von Transportern in der Zelloberfläche eine Stufe oder zumindest eine zunehmende Steigung in der IQ_{total} -Kurve erkennbar sein.

Aus zwei Gründen ist ausgeschlossen, daß zwei Konformationen des mGAT1, die GABA-Transport und Transporter-assoziierten Strom vermitteln, miteinander im Gleichgewicht stehen. Zum einen könnten unter diesem Umstand keine zwei K_I -Werte für einen Inhibitor gemessen werden. Zum andern ist zu beachten, daß der in Abbildung 4.2.14 vorgestellte Na^+ -Einstrom ein Mittel aus fünf verschiedenen Sätzen von Oozyten ist. Das Verhältnis von GABA-vermittelten Na^+ -Einstrom in Abwesenheit und Anwesenheit von SKF war in den verschiedenen Sätzen sehr unterschiedlich. Das spricht dafür, daß der vom GABA-Transport entkoppelte Na^+ -Einstrom nicht ausschließlich von mGAT1-spezifischen Eigenschaften vermittelt wird. Vielmehr ist anzunehmen, daß zelluläre Regulationsfaktoren bzw. posttranslationale Modifikationen die Konformation des mGAT1 derart beeinflussen, daß er entweder eine Transport-Konformation oder eine Transporter-assoziierte Konformation bildet und in dieser Konformation verbleibt. Entsprechend diesem Verhältnis werden Transportstrom und Transporter-assoziiierter Strom geleitet. Abbildung 4.3.2 stellt graphisch die beiden beschriebenen Konformationen sowie die Möglichkeit der Inhibition mit SKF dar.

Tabelle 4.3.1

In der Tabelle sind die im Text bereits vorgestellten Parameter noch einmal systematisch zusammengestellt. K_m -Werte wurden durch Kurvenanpassung nach Michaelis-Menten (Gleichung 6) ermittelt, K_I -Werte durch Kurvenanpassung nach Gleichung 5 und Gleichung 8. IC_{50} -Werte wurden aus den entsprechenden Figuren abgelesen

	$K_m [\mu M]$		$K_I [\mu M]$		$IC_{50} [\mu M]$	
	Strom	Aufnahme	Strom	Aufnahme	Strom	Aufnahme
GABA	17	62				
100 μM NA	116	114	1	50,6	25,5	384
25 μM SKF	140	138	0,03 * 7,6**	6,3	1,5	54
500 μM PMZ	5	100			750	790

* Der K_I -Wert bzw IC_{50} -Wert für SKF für den Transporter-assoziierten Strom

** Der K_I -Wert für SKF für den Transport Strom

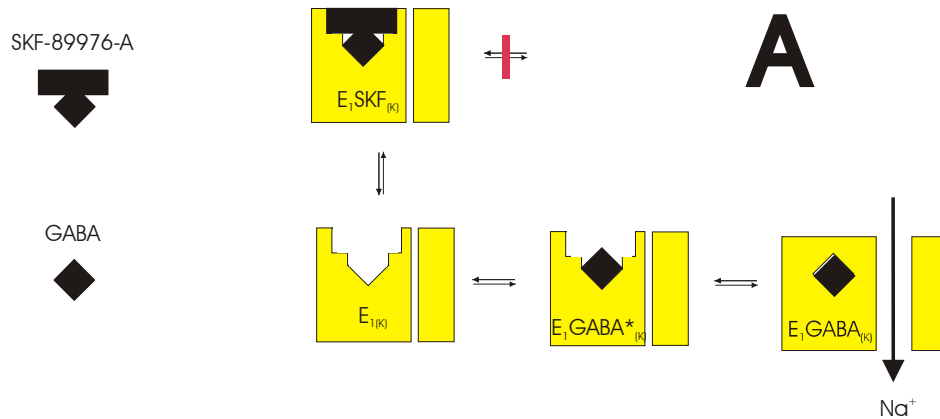
Die physiologische Bedeutung

Da *Xenopus* Oozyten das einzige heterologe Expressionssystem sind, an dem simultan elektrophysiologische Messungen und radioaktive Fluxmessungen durchgeführt

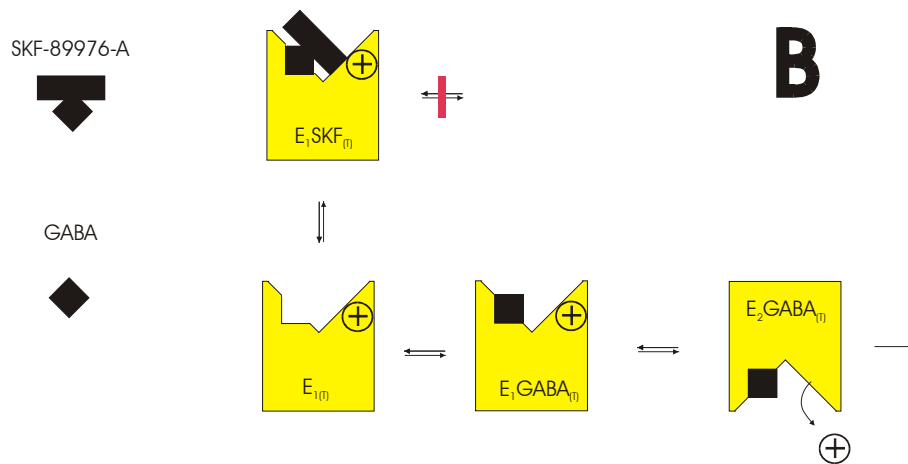
werden können, können direkte Beweise für die Existenz eines Transporter-assoziierten Stroms nur aus Experimenten mit Oozyten gewonnen werden. Allerdings weisen Untersuchungen in anderen heterologen Expressionssystemen darauf hin, daß es sich im Fall des Transporter-assoziierten Stroms nicht um ein oozytenspezifisches Phänomen handelt (Risso S. et al., 1996).

Eine Möglichkeit, dem Transporter-assoziiertem Strom eine physiologische Funktion zuzuschreiben, bietet der umgekehrte Transport-Modus des mGAT1. Nimmt man an, daß der umgekehrte Transportmodus des GAT1 tatsächlich mitverantwortlich ist für die Ausschüttung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt (Barakat L. et al., 2002), könnte ein aktivierter Transport-assoziiierter Strom lokal das Membranpotential senken und für eine forcierte GABA-Ausschüttung sorgen. Inwieweit diese Vermutung richtig ist, sei dahingestellt; festzuhalten bleibt, daß das Verständnis der physiologischen Funktion des Transport-assoziierten Stroms viel Raum zur Forschung gibt.

Abbildung 4.3.2



Modell (A) zeigt schematisch die Bindung von SKF und GABA am mGAT1 in Kanal-Konformation, die den Transporter-assoziierten Strom vermittelt. $E1_{(K)}$ stellt den mGAT1 im Ausgangszustand dar. Durch Bindung von GABA kann der mGAT1 eine Konformationsänderung eingehen, die über $E_1GABA^*_{(K)}$ als instabilem Zustand zu $E_1GABA_{(K)}$ führt. In diesem Zustand zeigt der mGAT1 eine spezifische Na^+ -Leitfähigkeit. Nach Bindung von SKF kann der mGAT1 keine Konformationsänderung mehr eingehen, eine Na^+ -spezifische Leitfähigkeit kann nicht mehr nachgewiesen werden.



Modell (B) zeigt schematisch die Bindung von SKF und GABA am mGAT1 in Transport-Konformation. $E1_{(T)}$ stellt den mGAT1 im Ausgangszustand dar, eine positive Ladung in Form eines Na^+ -Kations ist bereits gebunden. Durch Bindung von GABA kann der mGAT1 eine Konformationsänderung eingehen die zu $E_2GABA_{(T)}$ führt. Durch Entlassung des Na^+ Kations entsteht der Transport Strom. Der Einfache Pfeil symbolisiert ein Fortschreiten des Transportzyklus. Nach Bindung von SKF ist der mGAT1 im Zustand $E1SKF_{(T)}$ fixiert. Ein GABA-Transport ist nicht mehr möglich.

5 Phosphorylierung

5.1 Einleitung

In der Proteinbiosynthese können sich an den eigentlichen Prozeß der Polypeptidsynthese an den Ribosomen im Zytoplasma sogenannte posttranslationale Modifikationen anschließen. Darunter versteht man zum einen degradierende Schritte, wie das Proteinsplicing, und zum anderen aufbauende Schritte, wie die kovalente Bindung von Glycosylresten, Methylresten, Adenylresten oder Phosphat (Zur umfassenden Beschreibung der posttranslationalen Modifikation siehe Lehrbücher: Nelson D., Lehninger Principles of Biochemistry ; Berg J., Biochemie). Im Falle einer Proteinphosphorylierung werden an einer bestimmten Position im Protein zusätzliche negative Ladungen eingeführt, was durch Coulombsche Kräfte den Prozeß der Proteinfaltung und Proteinfunktion maßgeblich beeinflussen kann. Eine Proteinphosphorylierung zeigt nicht an allen Proteinen den selben Effekt. Abhängig von der Beschaffenheit des Proteins kann es sich um eine Aktivierung oder Inhibition handeln.

Regulation durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung gehört zu den Grundregulationsmechanismen jeder Zelle. Bedingt durch die Vielzahl der unterschiedlichen Zellen, Zellorganellen, Zielproteine und der unterschiedlichen zu regulierenden Funktionen gibt es eine sehr große Zahl phosphorylierender und dephosphorylierender Enzyme. Allein im Fall der Hefe sind etwa 120 unterschiedliche Protein-Kinasen bekannt (Zhu H. et al., 2000). In höheren Organismen muß man davon ausgehen, daß die Zahl eher zunimmt. Die im Protein zu phosphorylierenden Positionen sind die Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin.

Im Prozeß der Phosphorylierung sind Affinität und Effektivität der phosphorylierenden Enzyme mitbestimmt durch die Umgebung der zu phosphorylierenden Aminosäuren. Man spricht von Consensus-Sequenzen. Tabelle 5.1.1 zeigt die Consensus-Sequenzen der Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC). Weitere Consensus Sequenzen werden nicht gezeigt, da sie in dieser Arbeit nicht von Bedeutung sind.

Tabelle 5.1.1

	Consensus-Sequenz
PKA	-X-R-(R/K)-X-(<u>S/T</u>)-B-
PKC	-(R/K)-(R/K)-X-(<u>S/T</u>)-B-(R/K)-(R/K)-

S = Serin, T = Threonin, X = beliebige Aminosäure, B = jede hydrophobe Aminosäure, R = Arginin, K = Lysin

(Nelson D., Lehninger Principles of Biochemistry ; Berg J., Biochemie)

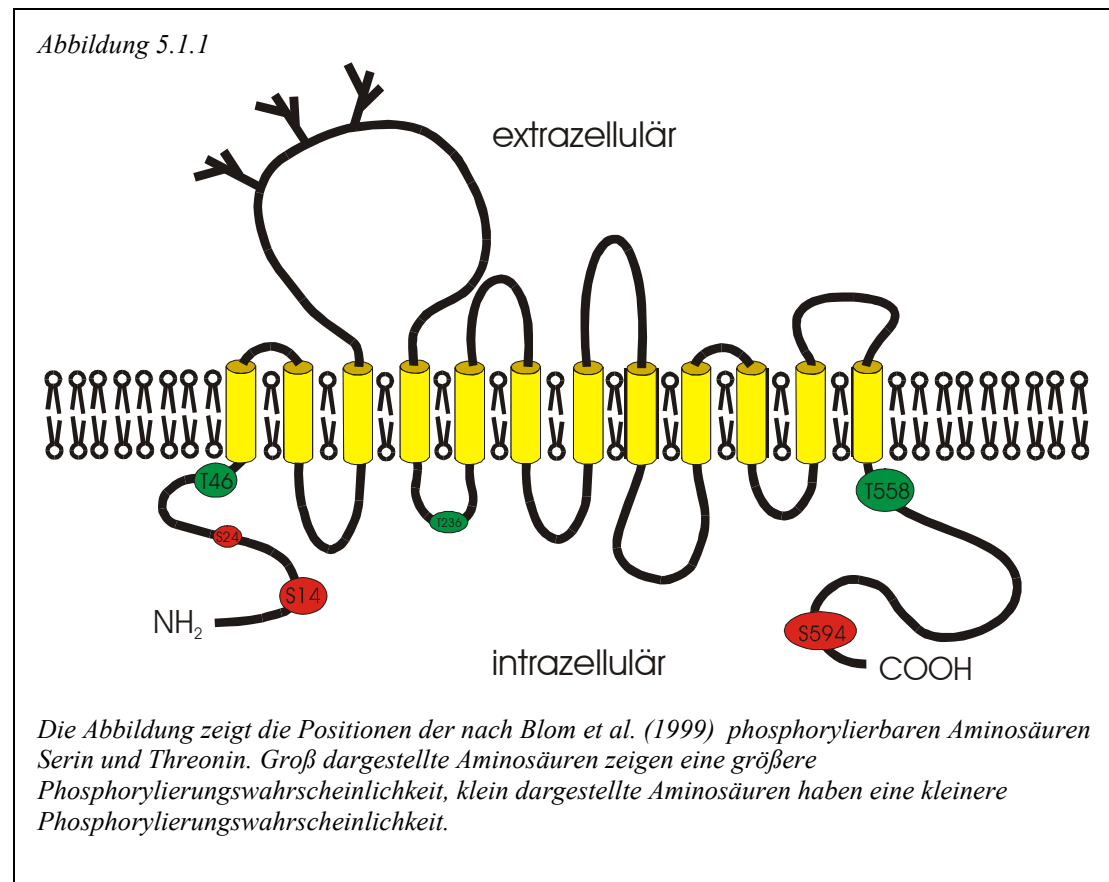
Das Vorhandensein einer Consensus-Sequenz bedeutet nicht notwendigerweise, daß die entsprechende Aminosäure phosphoryliert wird. Ebenso wenig ist davon auszugehen, daß die Abwesenheit einer Consensus-Sequenz eine Phosphorylierung ausschließt. Die Consensus-Sequenz ist vielmehr als ein die Phosphorylierungswahrscheinlichkeit verstärkender Faktor zu betrachten.

1999 haben Blom et al. unter Berücksichtigung der bekannten Consensus-Sequenzen einen Algorithmus entwickelt, der in Abhängigkeit der Aminosäure-Sequenz die Wahrscheinlichkeit einer Phosphorylierung berechnen kann. Abbildung 5.1.1 zeigt die im GAT1 zu erwartenden Phosphorylierungspositionen bezüglich Serin und Threonin (berechnet nach Blom N. et al., 1999).

Alle bekannten Na⁺/Cl⁻-abhängigen Neurotransmittertransporter (NET, DAT, SERT, GAT, GLYT) besitzen mögliche Phosphorylierungsstellen (Zahniser N. et al., 2001 ; berechnet nach Blom N. et al., 1999). Eine Regulation durch phosphorylierende bzw. dephosphorylierende Enzyme konnte für alle Na⁺/Cl⁻-abhängigen Neurotransmittertransporter gezeigt werden. Inwieweit sie dabei durch direkte Phosphorylierung und durch phosphorylierungsabhängige „second messenger“ vermittelte Reaktionskaskaden reguliert werden ist weitgehend ungeklärt; es scheinen jedoch beide Möglichkeiten eine Rolle zu spielen (Beckmann M. et al., 1998 ; Zahniser N. et al., 2001). Dabei werden in der Regel die Funktion oder der Expressionsgrad des Transporters gemeinsam reguliert.

Im Fall des GAT1 wird einheitlich angenommen, daß der Expressionsgrad abhängig von der Aktivität der verschiedenen phosphorylierenden Enzyme (Kinasen) durch eine Verschiebung von Transportern zwischen Zellmembran und Speichervesikeln reguliert werden kann (Corey J. et al., 1994 ; Quick M. et al., 1997 ; Whitworth T. et

al., 2001). Bei niedrigem Expressionsgrad scheint eine verstärkte Aktivität phosphorylierender Enzyme den Transporter vornehmlich von den Speichervesikeln in die Zellmembran zu verteilen, unabhängig davon, ob es sich bei dem regulierenden Enzym um Protein-Kinasen (Corey J. et al., 1994 ; Quick M. et al., 1997, Eckstein-Ludwig U., 1998) oder Tyrosin-Kinasen (Law R. et al., 2000 ; Whitworth T. et al., 2001) handelt. Bei hohem ursprünglichen Expressionsgrad wird in Abhängigkeit der PKC-Aktivität der Expressionsgrad reduziert (Quick M. et al., 1997).



Im Falle der Funktionsregulation des GAT1 zeigen die Publikationen der letzten Jahre kein eindeutiges Bild. Durch Aktivierung der Proteinkinase C konnte eine Inhibition der Funktion des GAT1 gezeigt werden (Gomez J. et al., 1991 ; Osawa I et al., 1994; Sato K. et al., 1995). Inhibition der Phosphatase 2B hatte allerdings auch eine Inhibition des GAT1 zur Folge (Goncalves P. et al., 1999). Die Unterschiedlichkeit in Stärke und Richtung der Regulation wird in der Regel mit der Vielfältigkeit der phosphorylierenden und dephosphorylierenden Enzyme erklärt. Auch wenn man gemeinhin bei den verwendeten Aktivator und Inhibitoren der phosphorylierenden und dephosphorylierenden Enzyme von spezifischen Aktivator und Inhibitoren

spricht, ist bei unterschiedlichen Zellsystemen, unterschiedlichen Klonen, unterschiedlichen Versuchsbedingungen und bei einer Zahl von allein mehr als 100 Kinasen, nicht davon auszugehen, daß alle durchgeführten Versuche unter den selben Voraussetzungen durchgeführt werden können (siehe auch Vasilets L., 1997).

Da in vielen Arbeitsgruppen ausschließlich mit biochemischen Methoden und radioaktiven Aufnahmemessungen gearbeitet wurde, sind die Ergebnisse bezüglich der Funktionsregulation des GAT1 schwerer faßbar und bieten weniger detaillierte Analysemöglichkeiten als Forschungsergebnisse mit elektrophysiologischen Methoden. Um die Funktionsregulation des einzelnen GAT1 bezüglich der Serin- und Threonin-Phosphorylierung bzw -Dephosphorylierung mit PKC, PKA, PP1, PP2A und PP2B besser zu verstehen, wurden endogene Enzyme aktiviert oder inhibiert, sowie exogene Enzyme in die Oozyte injiziert.

5.2 Resultate

Tabelle 5.2.1 zeigt die verwendeten Inhibitoren und Aktivatoren der phosphorylierenden und dephosphorylierenden Enzyme, sowie deren Enzymspezifität. Die zu untersuchenden Oozyten wurden mit den in Tabelle 5.2.1 aufgeführten Substanzen inkubiert.

Tabelle 5.2.1

Enzym	Aktivierung	Inhibierung
PKC	<i>PMA</i>	<i>Calphostin C</i>
PKA	<i>IBMX, Forskolin</i>	
PP1		<i>okadaic acid</i>
PP2A		<i>okadaic acid</i>

PMA: (Saitoh T. et al., 1986), CalphostinC: (Kobayashi E. et al., 1989), IBMX: (Freitag, A. et al., 1998), Forskolin: (de Souza N. et al., 1983), OkadaicAcid (Haystead T. et al., 1989)

5.2.1 Inkubation mit 100 nM PMA

Zur Stimulation der endogenen PKC der *Xenopus* Oozyten wurden diese bei einem Haltepotential von -60 mV mit 100 nM PMA in ORi inkubiert. Messungen wurden nach 0, 6, 10, 20 und 30 min durchgeführt. Es wurde eine spannungsunabhängige

Reduktion der mGAT1-vermittelten Steady-State- Ströme in Abhängigkeit der Zeit festgestellt (Abbildung 5.2.1A). Exemplarisch sind Abbildung 5.2.1B der normierte Zeitverlauf des mGAT1-vermittelten Stroms bei Potentialen von -100 mV und -50 mV dargestellt. Nach einer Kurvenanpassung einer abfallenden e-Funktion erster Ordnung (Gleichung 7, siehe Kapitel 8.2) sinkt der mGAT1-vermittelte Strom bei beiden Potentialen mit einer Zeitkonstanten von 16 min auf ein Minimum von 52% des mGAT1-vermittelten Stroms in Abwesenheit von PMA (Abbildung 5.2.1B).

Abbildung 5.2.1

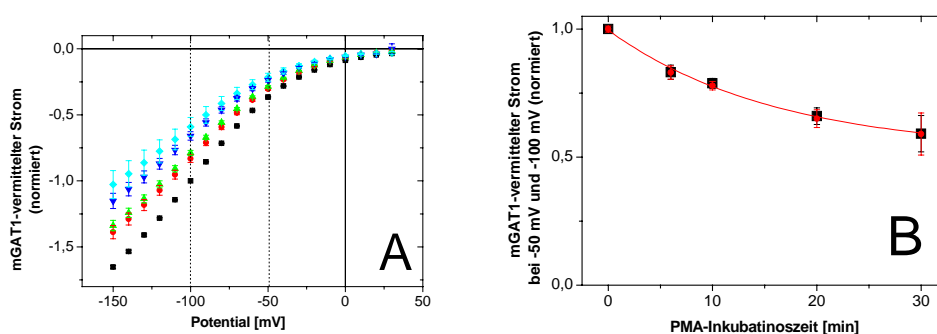


Abbildung (A) zeigt die mGAT1-vermittelten IV-Kurven unter Inkubation von 100 nM PMA. Folgende Tabelle beschreibt die einzelnen Kurven.

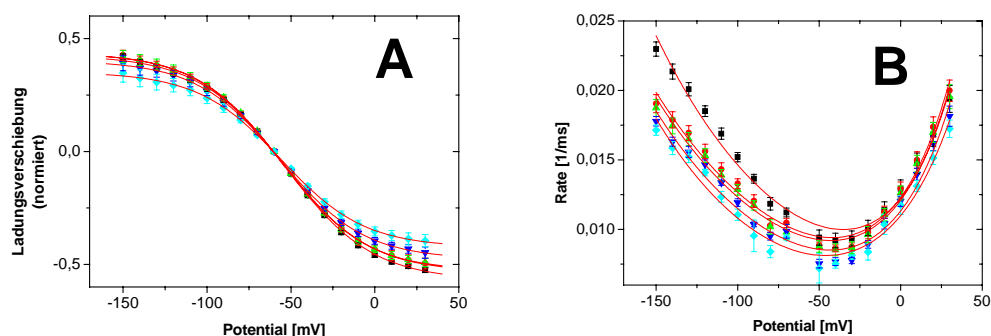
	Substrat	Aktivator	Inkubationszeit [min]
■	400 μ M GABA		0
●	400 μ M GABA	100 nM PMA	6
▲	400 μ M GABA	100 nM PMA	10
▼	400 μ M GABA	100 nM PMA	20
◆	400 μ M GABA	100 nM PMA	30

Es handelt sich um die Mittelwerte normierter Kurven von 4-9 Oozyten \pm SEM. Normiert wurde auf den mGAT1-vermittelte Strom bei -100 mV bei 0 min Inkubationszeit.

Abbildung (B) zeigt den mGAT1-vermittelten Strom bei -100 mV und -50 mV in Abhängigkeit der PMA-Inkubationszeit (Daten aus Abbildung A). Die rote Linie stellt eine Kurvenanpassung einer abfallenden e-Funktion erster Ordnung dar. Danach erreicht die PMA-induzierte Inhibition mit einer Zeitkonstante von 16 min eine Gleichgewichtseinstellung bei 52% des PMA freien mGAT1-vermittelten Stroms.

Die durch Kurvenanpassung nach Fermi (Gleichung 2) erhaltenen Q_{total} -Werte der dazugehörigen QV-Kurven nehmen in Abhängigkeit der Zeit ab. Die anderen

Abbildung 5.2.2



Die Abbildung zeigt die QV-Kurven (A) und die RateV-Kurven (B) unter Inkubation von 100 nM PMA. Folgende Tabelle beschreibt die einzelnen Kurven.

	Substrat	Aktivator	Inkubationszeit [min]
■	ORi		0
●	ORi	100 nM PMA	6
▲	ORi	100 nM PMA	10
▼	ORi	100 nM PMA	20
◆	ORi	100 nM PMA	30

Bei den QV-Kurven (A) handelt es sich um normierte Mittelwerte von 4-9 Oozyten \pm SEM. Normiert wurde auf den Q_{total} -Wert der jeweiligen Oozyte bei 0 min Inkubationszeit. Die roten Linien stellen Kurvenanpassungen nach Fermi (Gleichung 2) dar. Die angepassten Parameter sind in Tab I dargestellt.

Tab I

	$E_{1/2}$ [mV]	z_F	Q_{total} (normiert)
0 min	-52,4	1,04	0,99
6 min	-54,6	1,03	0,97
10 min	-55,3	1,01	0,96
20 min	-56,6	1	0,87
30 min	-55,7	0,99	0,77

Die RateV-Kurven (B) sind Mittelwerte von 4-9 Oozyten \pm SEM. Die roten Linien stellen Kurvenanpassungen nach Gleichung 4 dar. Die angepassten Parameter sind in Tab II dargestellt.

Tab II

	k_{bind} [1/ms]	z_{bind}	k_{diss} [1/ms]	z_{diss}
0 min	0,005	0,259	0,0072	0,68
6 min	0,0046	0,242	0,0077	0,67
10 min	0,0044	0,248	0,0077	0,65
20 min	0,0039	0,259	0,0075	0,645
30 min	0,0032	0,283	0,0077	0,59

Parameter der Fermi-Anpassung, effektive Valenz z_F und $E_{1/2}$ -Wert, ändern sich nicht in Abhängigkeit der PMA-Inkubationszeit (Abbildung 5.2.2 TabI).

Die RateV-Kurven werden durch Inkubation mit 100 nM PMA reguliert (Abbildung 5.2.2B). Die Ratenbindungskonstanten k_{bind} werden durch PMA-Inkubation in Abhängigkeit der Zeit reduziert. Die Ratendissoziationskonstanten k_{diss} scheinen unbeeinflusst. Alle anderen Parameter der Kurvenanpassung bleiben unbeeinflusst (Abbildung 5.2.2 TabII).

5.2.2 Inkubation mit 450 nM Calphostin C

Zur Inhibition der endogenen PKC der *Xenopus* Oozyten wurden diese bei einem Haltepotential von -60 mV mit 450 nM Calphostin C (CC) in ORi inkubiert. Messungen wurden nach 0, 6, 10, 20 und 30 min durchgeführt. Es wurde eine spannungsunabhängige Reduktion der mGAT1-vermittelten Steady-State-Ströme in Abhängigkeit der Zeit festgestellt (Abbildung 5.2.3A). Exemplarisch sind Abbildung 5.2.3B der normierte Zeitverlauf des mGAT1-vermittelten Stroms bei Potentialen von -100 mV und -50 mV dargestellt. Nach einer Kurvenanpassung einer abfallenden e-Funktion erster Ordnung fällt der mGAT1-vermittelte Strom in beiden Fällen mit einer Zeitkonstanten von 4 min auf ein Minimum von 72% des mGAT1-vermittelten Stroms in Abwesenheit von CC ab.

Abbildung 5.2.3

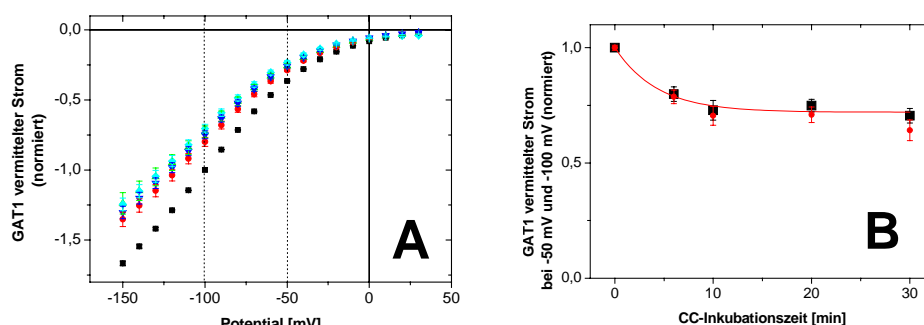


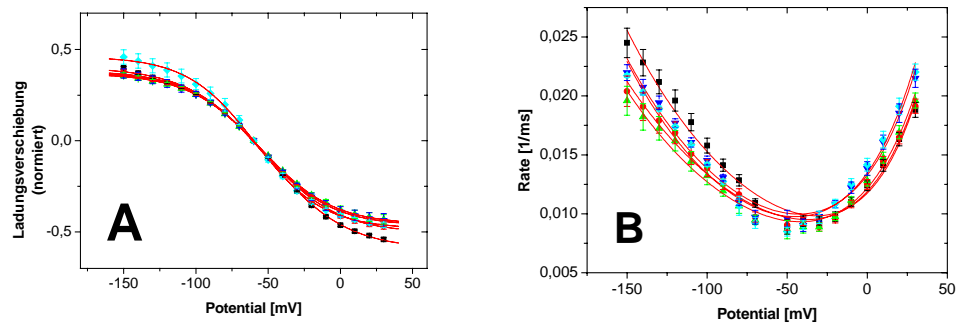
Abbildung (A) zeigt die mGAT1-vermittelten IV-Kurven unter Inkubation von 450 nM CC. Folgende Tabelle beschreibt die einzelnen Kurven.

	Substrat	Aktivator	Inkubationszeit [min]
■	400 μ M GABA		0
●	400 μ M GABA	450 nM CC	6
▲	400 μ M GABA	450 nM CC	10
▼	400 μ M GABA	450 nM CC	20
◆	400 μ M GABA	450 nM CC	30

Es handelt sich um die Mittelwerte normierter Kurven von 4-9 Oozyten \pm SEM. Normiert wurde auf den mGAT1-vermittelten Strom bei -100 mV bei 0 min Inkubationszeit. Abbildung (B) zeigt den mGAT1-vermittelten Strom bei -100 mV und -50 mV in Abhängigkeit der CC-Inkubationszeit (Daten aus Abbildung A). Die rote Linie stellt eine Kurvenanpassung einer abfallenden e-Funktion erster Ordnung dar. Danach erreicht die CC-induzierte Inhibition bei einer Zeitkonstante von 4 min ein Minimum bei 72% des CC freien mGAT1-vermittelten Stroms.

Die durch Kurvenanpassung nach Fermi (Gleichung 2) erhaltenen Q_{total} -Werte der dazugehörigen QV-Kurven scheinen durch die CC-Inkubation reguliert zu werden. Eine konstante zeitabhängige Regulation ist jedoch nicht zu erkennen (Abbildung 5.2.4A TabI). Die effektive Valenze z_F und die Na^+ -Affinität, repräsentiert durch den $E_{1/2}$ -Wert, werden in Abhängigkeit der CC-Inkubationszeit kontinuierlich reduziert. Die RateV-Kurven werden durch Inkubation mit 450 nM CC verändert. Die Ratenbidungskonstanten k_{bind} (linker Ast der RateV-Kurve) werden durch CC-Inkubation in Abhängigkeit der Zeit reduziert (Abbildung 5.2.4B). Die Ratendissoziationskonstanten k_{diss} (rechter Ast der RateV-Kurve) nehmen kontinuierlich mit der Zeit zu. Die effektiven Valenzen z_{bind} und z_{diss} bleiben unbeeinflusst (Abbildung 5.2.4 TabII).

Abbildung 5.2.4



Die Abbildung zeigt die QV -Kurven (**A**) und die $RateV$ -Kurven (**B**) unter Inkubation von 450 nM CC. Folgende Tabelle beschreibt die einzelnen Kurven.

	Substrat	Aktivator	Inkubationszeit [min]
■	ORi		0
●	ORi	450 nM CC	6
▲	ORi	450 nM CC	10
▼	ORi	450 nM CC	20
◆	ORi	450 nM CC	30

Bei den QV -Kurven (**A**) handelt es sich um normierte Mittelwerte von 4-9 Oozyten \pm SEM. Normiert wurde auf den Q_{total} -Wert der jeweiligen Oozyte bei 0 min Inkubationszeit. Die roten Linien stellen Kurvenanpassungen nach Fermi (Gleichung 2) dar. Die angepassten Parameter sind in **Tab I** dargestellt.

Tab I

	$E_{1/2}$ [mV]	z_F	Q_{total} (normiert)
0 min	-50,3	1,09	0,99
6 min	-53,6	1,03	0,89
10 min	-54,8	1	0,82
20 min	-55,1	0,98	0,84
30 min	-58,9	0,94	0,94

Die $RateV$ -Kurven sind Mittelwerte von 4-9 Oozyten \pm SEM. Die roten Linien stellen Kurvenanpassungen nach Gleichung 4 dar. Die angepassten Parameter sind in **Tab II** dargestellt.

Tab II

	k_{bin} [1/ms]	z_{bin}	k_{diss} [1/ms]	z_{diss}
0 min	0,0051	0,268	0,0061	0,72
6 min	0,0049	0,245	0,007	0,689
10 min	0,0043	0,257	0,0078	0,646
20 min	0,0043	0,28	0,009	0,62
30 min	0,0039	0,29	0,0096	0,61

5.2.3 Inkubation mit 10 μ M Forskolin und 100 μ M IBMX

Zur Stimulation der endogenen PKA der *Xenopus* Oozyten wurden diese bei einem Haltepotential von -60 mV mit einer Kombination von 10 μ M Forskolin und 100 μ M IBMX in ORi inkubiert. Messungen wurden nach 0, 6 und 10 min durchgeführt. Es wurde eine Reduktion der mGAT1-vermittelten Ströme festgestellt. Ob die Reduktion zeit- oder spannungsabhängig war, kann aufgrund der wenigen Meßdaten nicht gesagt werden. Ebenso erlaubt der Mangel an Daten keine genaue Analyse der QV-Kurven und der RateV-Kurven.

5.2.4 Inkubation von 100 nM Okadaic acid

Zur Inhibition der endogenen PP1 und PP2A der *Xenopus* Oozyten wurden diese bei einem Haltepotential von -60 mV mit 100 nM Okadaic Acid (OA) in ORi inkubiert. Da OA nur einen komplett auswaschbaren Effekt zeigte, wurde dieser Effekt im Kapitel Kanalmodus beschrieben (Abbildung 4.2.16). Es konnten keine Hinweise für eine mGAT1-Regulation durch Phosphatase-Inhibition gefunden werden.

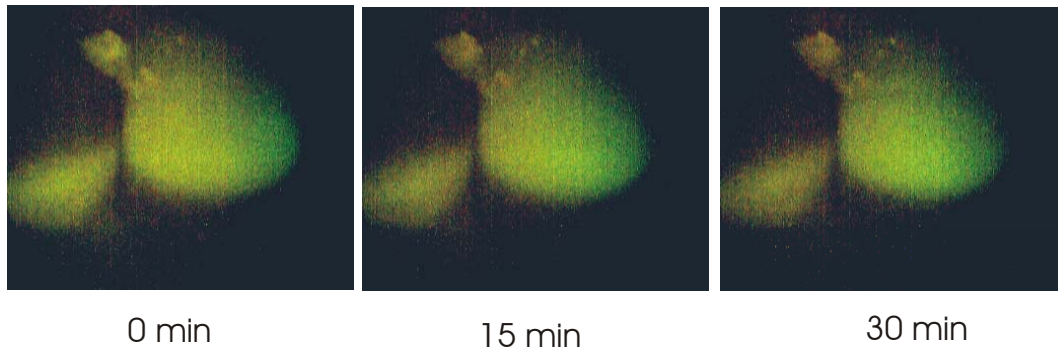
5.2.5 Injektion von Kinasen und Phosphatasen in Oozyten

Die Methode der Enzyminjektion bietet die Möglichkeit, die Konzentration eines aktiven Enzyms im Zytoplasma ohne Zugabe weiterer Substanzen zu erhöhen. Damit hat man gegenüber der Enzyminduktion den Vorteil, daß der mGAT1 nur durch das injizierte exogene Enzyme reguliert wird, und keine Artefakte durch unspezifische Aktivatoren oder Inhibitoren erzeugt werden.

Injiziert wurden je 23 nl der Kinase PKC (Ratte) und der Phosphatase PP2B (Mensch). Um sicher zu stellen, daß sich die injizierten Enzyme im Zytoplasma der Oozyte gleichmäßig verteilten und sich nicht in einem Punkt um die Spitze der Injektionsnadel konzentrierten, wurde rekombinantes „green fluorescent protein“ (GFP) mit einem Molekulargewicht von 27 kD in die Oozyte injiziert und dessen Verteilung unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet (Abbildung 5.2.5). Das Molekulargewicht des GFP entspricht dem Molekulargewicht der injizierten Enzyme. Bei einem injizierten Volumen von 4,6 nl GFP-Lösung, konnte nach ca. 20 bis 30 min kein weiterer Verteilungsvorgang mehr beobachtet werden. Bei größerem injiziertem Volumen muß durch die stärkere Bewegung des Zytoplasmas und durch den sich

aufbauenden größeren intrazellulären Konzentrationsgradienten von einer schnelleren Verteilung ausgegangen werden

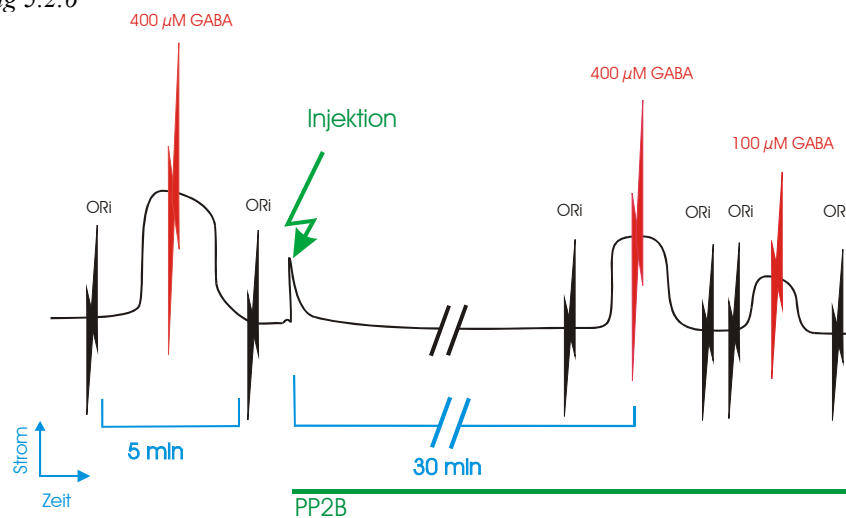
Abbildung 5.2.5



Die Abbildung vermittelt einen Eindruck der GFP-Diffusionsgeschwindigkeit im Zytoplasma der Oocyte. Dargestellt sind zwei Oozyten. Die linke Oocyte ist eine Kontrolloozyte, in die kein GFP injiziert war; in die rechte Oocyte wurden 4,6 nl rekombinantes GFP in einer Konzentration von 0,2 µg/µl injiziert. Angeregt wurde die Fluoreszenz mit einer Quecksilberdampflampe, zur Überwachung der Fluoreszenz wurde Licht mit einer Wellenlänge kleiner als 488 nm herausgefiltert. Die vegetative Hemisphäre der Oocyte zeigt bei den genannten Bedingungen eine eigene Fluoreszenz. Oberhalb der rechten Oocyte ist die Injektionskapillare zu erkennen. Das Bild (0 min) ist zum Zeitpunkt der GFP Injektion aufgenommen, man erkennt auf der der Injektionskapillare gegenüberliegenden Seite der Oocyte die GFP Fluoreszenz. Die Diffusion scheint nach 30 min abgeschlossen zu sein. Das Experiment konnte an mehreren Oozyten wiederholt werden.

Vor der Injektion des jeweiligen Enzyms werden zur Normierung drei Messungen vorgenommen, eine in Anwesenheit von GABA und jeweils eine vorher und nachher in Abwesenheit von GABA (Abbildung 5.2.6). Nach der dritten Messung werden bei einem Haltepotential von -60 mV die Injektionsnadel in die Oocyte gestochen und sofort 23 nl des jeweiligen Enzyms injiziert. Während einer Inkubationszeit von 30 min (Diffusionszeit des jeweiligen Enzyms, siehe Abbildung 5.2.5) wird die Oocyte bei einem Potential von -60 mV gehalten. Nach der Inkubationszeit folgen weitere Messungen. Zu Referenzmessungen wurde der Puffer des jeweiligen Enzyms in die zu messenden Oozyten injiziert.

Abbildung 5.2.6



Die Abbildung zeigt schematisch den Zeitverlauf des Haltestroms bei -60 mV eines kompletten Experimentes mit PP2B Injektion. Die erste GABA Messung geschieht vor der Injektion des Enzyms, weitere GABA-Messungen folgen 30 min nach Injektion des Enzyms. Die Injektion ist mit einem grünen Pfeil markiert. Das kurzzeitige Ansteigen des Stroms rührt daher, daß direkt vor der Injektion die Injektionskapillare in die Oozyte gestochen wird. Nach der Injektion wird die Injektionskapillare nicht zurückgezogen. Werden nach Injektion mehrere Substratkonzentrationen gemessen wird bei den unterschiedlichen Oozyten eine unterschiedliche Konzentrationssequenz gewählt, um zeitabhängige Effekte auszugleichen. Die Zeitskala der Abbildung ist verzerrt. In der Tat nimmt der 30 minütige Inkubationsabschnitt wesentlich mehr Raum ein.

5.2.6 Injektion von PKC

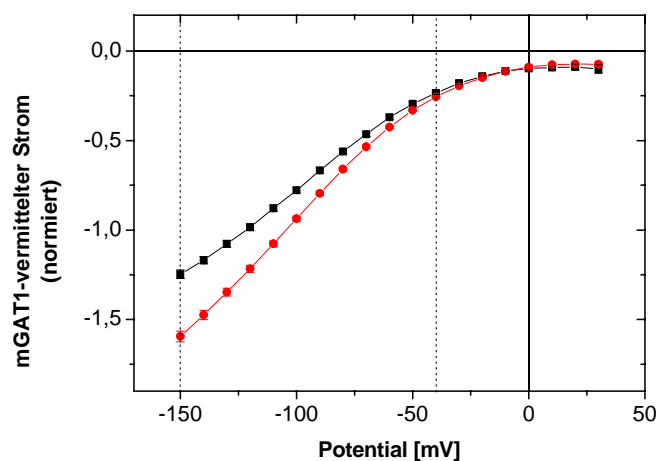
Zur Untersuchung der PKC-abhängigen Phosphorylierung des mGAT1 wurden pro Oozyte 23 nl PKC injiziert. Nach Injektion der PKC konnte nach 30 min keine Regulation des mGAT1 beobachtet werden. IV-Kurven, QV-Kurven und RateV-Kurven von PKC-injizierten und PKC-Puffer-injizierten Zellen waren identisch (keine Abbildung).

5.2.7 Injektion von PP2B

Zur Untersuchung der PP2B-abhängigen Dephosphorylierung des mGAT1 wurden pro Oozyte 23 nl PP2B injiziert. Nach Injektion von 23 nl PP2B zeigt die IV-Kurve nach 30 min eine spannungsabhängige Inhibition des mGAT1 vermittelten Steady-State-Stroms (Abbildung 5.2.7). Im signifikant unterschiedlichen Bereich der beiden Kurven fällt die Inhibition von 78 % des Referenzstroms bei -150 mV auf 91% des Referenzstroms bei -40 mV ab. Nach weiteren 30 min Inkubationszeit wird der Grad

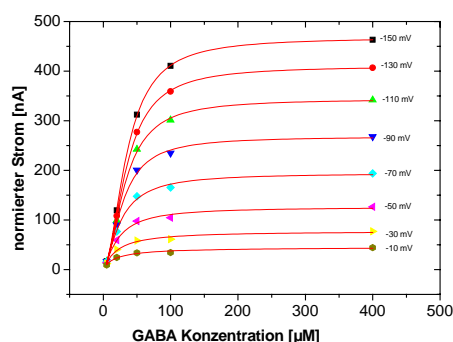
der Inhibition um weitere 10% verstärkt. Diese Zeitabhängigkeit der Inhibition konnte wegen ungenügender Stabilität der Oozyten allerdings nur an 3 Zellen beobachtet werden (keine Abbildung). Die Inhibition des mGAT1-vermittelten Stroms hängt von der in der Messung verwendeten GABA-Konzentration ab. Führt man Kurvenanpassungen nach Hill an die GABA-Konzentrationsabhängigkeiten der mGAT1-vermittelten Ströme durch, erhält man für jedes vorgegebene Potential die aus der Hill-Gleichung (Gleichung 9) resultierenden Parameter n_{Hill} , K_m und I_{max} (Abbildung 5.2.8). In Abbildung 5.2.8 sind exemplarisch die Kurvenanpassungen an die mGAT1-vermittelten Ströme bei mehreren Potentialen sowie die durch Kurvenanpassung ermittelten Parameter dargestellt.

Abbildung 5.2.7



Die Abbildung zeigt die IV-Kurven des mGAT1 in Gegenwart von $400\mu\text{M}$ GABA in Oozyten, in die entweder 23 nl PP2B (■) oder 23 nl PP2B-Puffer (●) injiziert wurden. Es handelt sich um die normierten Mittelwerte \pm SEM von 24 Oozyten. Normiert wurde bei 0 Minuten auf den mGAT1-vermittelten Strom bei -100 mV in Gegenwart von $400\mu\text{M}$ GABA. Die gezeigten IV-Kurven wurden 30 min nach Injektion des Puffers oder Enzyms aufgenommen. Im Bereich von -150 mV bis -40 mV unterscheiden sich die beiden Kurven signifikant ($p < 0,05$). Der Signifikanzbereich ist von den gepunkteten Linien eingeschlossen.

Abbildung 5.2.8

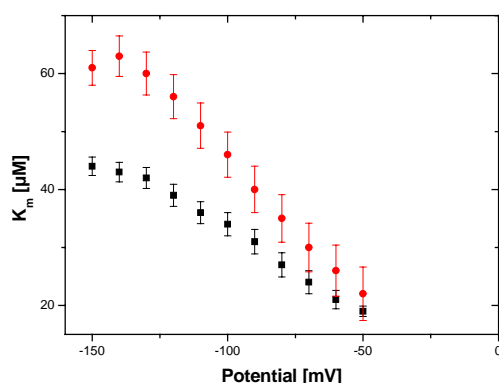


	K_m [μM]	n_{Hill}	I_{max} [nA]
-150 mV	35	1,9	468
-130 mV	34	1,9	410
-110 mV	32	1,8	343
-90 mV	28	1,7	268
-70 mV	25	1,5	194
-50 mV	22	1,3	126
-30 mV	20	1,1	77
-10 mV	19	0,9	45

Die Abbildung zeigt eine typische Strom GABA-Konzentrationsabhängigkeit. Um zu verdeutlichen, daß der mGAT1 mit steigender GABA-Konzentration steigende Ströme zeigt, wurden alle hier aufgeführten Ströme mit $-I$ normiert. Der Graph zeigt die Ströme bei -150 mV (■), -130 mV (●), -110 mV (▲), -90 mV (▼), -70 mV (◆), -50 mV (◀), -30 mV (▶) und -10 mV (●). Die roten Linien stellen Kurvenanpassungen nach Hill (Gleichung 9) dar. Die Tabelle zeigt die durch Kurvenanpassung erhaltenen Parameter.

Im Fall von PP2B-injizierten Oozyten zeigen die Parameter n_{Hill} und I_{max} keine Unterschiede zu PP2B-Puffer-injizierten Oozyten. Der K_m -Wert jedoch ist nach Injektion von PP2B deutlich spannungsabhängig reduziert (Abbildung 5.2.9). Im Bereich von -150 mV bis -50 mV unterscheiden sich die K_m -Werte, für Potentiale > -50 mV scheinen sie sich zu überlagern. In Abbildung 5.2.9 sind nur die K_m -Werte im Bereich von -150 mV bis -50 mV dargestellt. Bei kleineren Potentialen werden die Kurvenanpassungen zu ungenau.

Abbildung 5.2.9

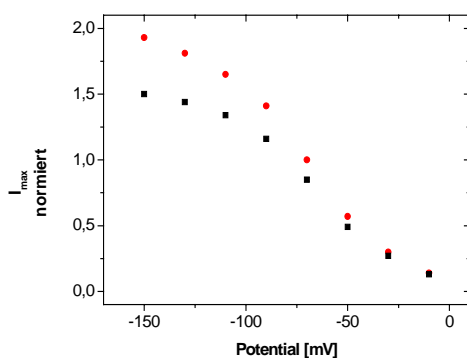


Die Abbildung zeigt die Spannungsabhängigkeit des K_m Wertes für GABA am mGAT1 in Oozyten, in die entweder 23 nl PP2B (■) oder 23 nl PP2B-Puffer (●) injiziert wurden. Ermittelt wurden die K_m Werte durch eine Kurvenanpassung nach Hill an GABA Konzentrationsabhängigkeiten nach Injektion von PP2B und nach Injektion von PP2B-Puffer. Die Fehlerbalken stellen χ^2 Fehler dar und sind nur als Maß der Genauigkeit der Kurvenanpassung zu werten, sie stellen kein Maß für die Signifikanz der Ergebnisse dar. Bei Werten kleiner als -50 mV zeigt sich eine größere Ungenauigkeit, ein Überlagern der beiden Kurven war jedoch festzustellen.

Im Gegensatz zur GABA-Konzentrationsabhängigkeit zeigt die Na^+ -Konzentrationsabhängigkeit der mGAT1-vermittelten Ströme eine PP2B-abhängige Regulation nur in I_{\max} (siehe Abbildung 5.2.10). n_{Hill} und K_m -Wert werden durch PP2B-Injektion nicht reguliert.

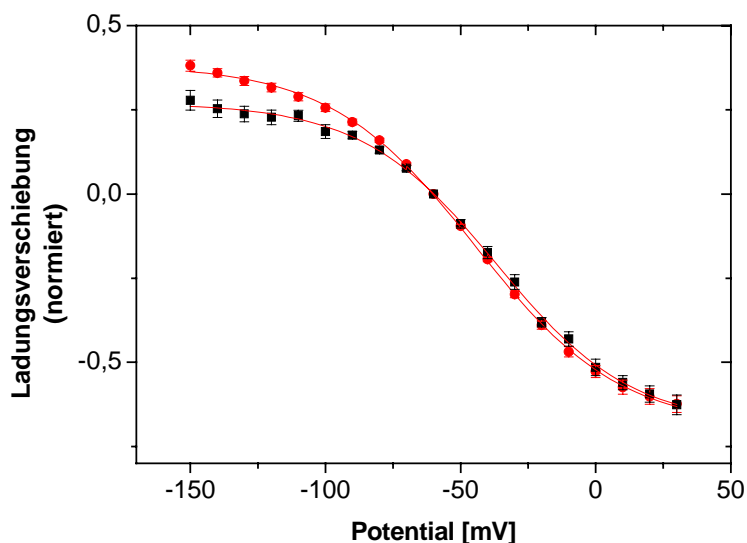
Die QV-Kurven zeigen 30 min nach Injektion von 23 nl PP2B eine Reduktion des Q_{total} -Wertes auf 88% des Referenzwertes (siehe Abbildung 5.2.11). Die Na^+ -Affinität, repräsentiert durch den $E_{1/2}$ -Wert wird reduziert. In der Tat ist diese Reduktion nur bei einer Na^+ -Konzentration von 90 mM erkennbar. Bei Na^+ -Konzentration von 10 mM, 30 mM und 50 mM ist nach PP2B-Injektion keine deutliche Veränderung des $E_{1/2}$ -Wertes gegenüber dem Referenzwerte erkennbar. Auch die andern Parameter einer Kurvenanpassung nach Fermi (Gleichung 2) werden nicht in Abhängigkeit der Na^+ -Konzentration nach PP2B-Injektion verändert.

Abbildung 5.2.10



Die Abbildung zeigt die Spannungsabhängigkeit des I_{\max} Wertes für Na^+ am mGAT1 in Oozyten, in die entweder 23 nl PP2B (■) oder 23 nl PP2B-Puffer (●) injiziert wurden. Ermittelt wurden die I_{\max} Werte durch eine Kurvenanpassung nach Hill (Gleichung 9) an Na^+ -Konzentrationsabhängigkeiten nach Injektion von PP2B und nach Injektion von PP2B-Puffer. Die Reduktion des I_{\max} Wertes für Na^+ durch PP2B ist spannungsabhängig. Im Bereich von -150 mV bis -10 mV fällt die Reduktion linear von 77% auf 93% der Referenzmessung ab.

Abbildung 5.2.11

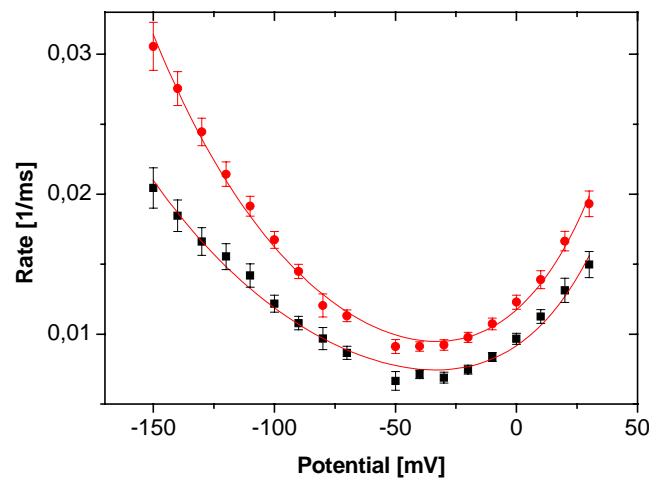


Die Abbildung zeigt die normierten QV -Kurven des mGAT1 in Abwesenheit von GABA in Oozyten, in die entweder 23 nl PP2B (■) oder 23 nl PP2B-Puffer (●) injiziert wurden. Es handelt sich um Mittelwerte \pm SEM von jeweils 24 Oozyten. Die gezeigten QV -Kurven wurden 30 min nach Injektion des Puffers oder Enzyms aufgenommen. Normiert wurde auf die Maximalamplitude der QV -Kurven in Abwesenheit von GABA, Enzym und Puffer. Die roten Linien sind Kurvenanpassungen nach Fermi (Gleichung 2). Die folgende Tabelle zeigt die durch die Anpassung erhaltenen Parameter.

		Q_{total} [pC]	z_F	$E_{1/2}$ [mV]
■ mGAT1 Oozyte + 23 nl PP2B	$n = 24$	0,96	0,99	-36,7
● mGAT1 Oozyte + 23 nl PP2B-Puffer	$n = 24$	1,08	1,07	-44,5

Die RateV-Kurve bei 90 mM Na^+ ist 30 min nach Injektion von 23 nl PP2B im gesamten Spannungsbereich von -150 mV bis $+30$ mV gegenüber der Referenzmessung signifikant reduziert (Abbildung 5.2.12). Nach Kurvenanpassung mit Gleichung 4 scheint diese Regulation hauptsächlich durch eine Reduktion der Ratenddissoziationskonstanten k_{diss} verursacht zu sein (Abbildung 5.2.12 Tabelle).

Abbildung 5.2.12



Die Abbildung zeigt die RateV-Kurven des mGAT1 in Abwesenheit von GABA in Oozyten, in die entweder 23 nl PP2B (■) oder 23 nl PP2B-Puffer (●) injiziert wurden. Es handelt sich um Mittelwerte \pm SEM von jeweils 24 Oozyten. Die gezeigten RateV-Kurven wurden 30 min nach Injektion des Puffers oder Enzyms aufgenommen. Die roten Linien sind Kurvenanpassungen nach Gleichung 4. Die folgende Tabelle zeigt die durch die Kurvenanpassung erhaltenen Parameter.

		k_{bind} [1/ms]	z_{bind}	k_{diss} [1/ms]	z_{diss}
■ mGAT1 Oocyte + 23 nl PP2B	$n = 24$	0,00352	0,3	0,00565	0,7
● mGAT1 Oocyte + 23 nl PP2B-Puffer	$n = 24$	0,00395	0,34	0,00779	0,66

Die genauere Analyse der RateV-Kurven bei unterschiedlichen Na^+ -Konzentrationen von 30 mM und 90 mM zeigt jedoch, daß sowohl die Ratenbindungskonstante k_{bind} als auch die Ratendissoziationskonstanten k_{diss} durch PP2B reguliert werden (Tabelle 5.2.2). Bei 30 mM Na^+ ist die Ratendissoziationskonstante k_{diss} auf 85% des Referenzwertes reduziert, bei 90 mM Na^+ auf 66% des Referenzwertes. Bei der Ratenbindungskonstante k_{bind} ist dieses Verhältnis genau umgekehrt. Hier sinkt unter PP2B-Einwirkung der Wert der Ratenbindungskonstante k_{bind} bei 30 mM Na^+ auf 51% der Referenz, bei 90 mM Na^+ nur auf 81 % der Referenz.

Obwohl zum Erhalt der Parameter in der Tabelle von Abbildung 5.2.12 und der Parameter in Tabelle 5.2.2 der gleiche Versuch durchgeführt wurde, unterscheiden sie sich leicht, da an unterschiedlichen Oozyten gemessen wurde.

Tabelle 5.2.2

	k_{bind} [1/ms]	z_{bind}	k_{diss} [1/ms]	z_{diss}
mGAT1 Oocyte + 23 nl PP2B 90 mM Na⁺	0,0036	0,29	0,0054	0,71
mGAT1 Oocyte + 23 nl PP2B-Puffer 90 mM Na⁺	0,0044	0,34	0,0081	0,67
mGAT1 Oocyte + 23 nl PP2B 30 mM Na⁺	0,00163	0,32	0,0229	0,64
mGAT1 Oocyte + 23 nl PP2B-Puffer 30 mM Na⁺	0,00315	0,3	0,0269	0,66

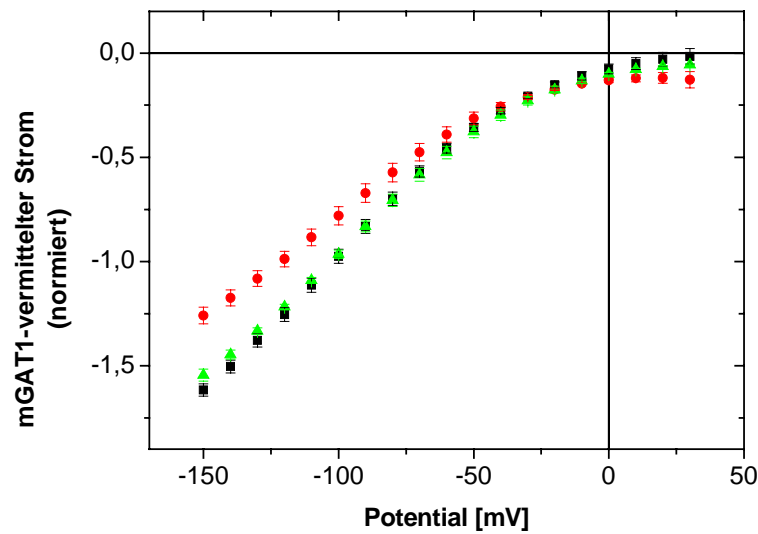
Die Tabelle zeigt die Parameter, die aus Kurvenanpassungen nach Gleichung 4 an die RateV-Kurven des mGAT1 bei Na⁺-Konzentrationen von 90 mM und 30 mM erhalten wurden. Verglichen werden die Parameter von Oozyten, in die entweder 23 nl PP2B oder 23 nl PP2B-Puffer injiziert wurden.

5.2.8 Koinjektion von PP2B und PKC

Um zu prüfen, ob PKC einer Regulation durch PP2B am mGAT1 entgegenwirkt, wurde ein Gemisch beider Enzyme in die Oozyten injiziert. Das injizierte Gemisch bestand aus je 23 nl des entsprechenden Enzyms oder entsprechenden Puffers. Der in Abbildung 5.2.7 beschriebene Effekt von PP2B-injizierten Oozyten wird unter Koinjektion von PP2B und PKC aufgehoben (Abbildung 5.2.13).

Koinjektion von PP2B und PKC zeigt keinen signifikanten Einfluß auf die QV-Kurven. Auch die RateV-Kurven bleiben durch die Koinjektion unbeeinflusst (keine Abbildung).

Abbildung 5.2.13



Die Abbildung zeigt die IV-Kurven des mGAT1 in Gegenwart von 400 μ M GABA nach Injektion von PKC und PP2B.

		PP2B 23 nl	PP2B Puffer 23 nl	PKC 23 nl	PKC Puffer 23 nl
■	n=4	+		+	
●	n=4	+			+
▲	n=4		+		+

Es handelt sich um die normierten Mittelwerte \pm SEM von 4 Oozyten. Normiert wurde auf den mGAT1-vermittelten Strom bei -100 mV in Gegenwart von 400 μ M GABA, bevor Enzym oder Puffer injiziert wurden. Die gezeigten IV-Kurven wurden 30 min nach Injektion des Puffers oder Enzyms aufgenommen.

5.3 Diskussion

Regulation durch Inkubation

Bei der Auswertung aller erhaltenen Meßergebnisse muß bedacht werden, daß eine direkte Interaktion des mGAT1 mit einem der eingesetzten Inhibitoren, Aktivatoren oder Enzyme nicht ausgeschlossen werden kann. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit Artefakte zu erzeugen bei den Inkubationsexperimente größer als bei den Injektionsexperimenten. Zum einen kommen bedingt durch den Versuchsaufbau die Inhibitoren und Aktivatoren der Enzyme während der Inkubation mit der

intrazellulären und extrazellulären Seite des mGAT1 in Kontakt, d.h., sie haben mehr Möglichkeiten zu interagieren. Zum anderen ist nie auszuschließen, daß Aktivatoren und Inhibitoren, die als spezifisch deklariert sind, nicht doch mit anderen Enzymen interagieren. Die Wahrscheinlichkeit für eine Interaktion mit aktiven Positionen im GAT1 scheint für relativ kleine Moleküle, wie die benutzen Aktivatoren oder Inhibitoren, größer zu sein als für große Moleküle, wie die injizierten Enzyme. In der Tat zeigen die Meßergebnisse, daß der als spezifisch deklarierte PP2A-Inhibitor Okadaic Acid (OA) direkt mit dem GAT1 interagiert. Durch Inkubation von 100 nM OA wurde der mGAT1-vermittelte Strom fast komplett blockiert, wohingegen der GABA Transport bei dieser Konzentration kaum beeinflußt wurde (siehe Abbildung 4.2.16). Die Inhibition des Stroms war reversibel (keine Abbildung).

PKC-Aktivierung

Die PMA-induzierte Reduktion von mGAT1-vermitteltem Strom und Maximalamplitude der Ladungsverschiebung Q_{total} unterscheiden sich in ihrer Zeitabhängigkeit und Stärke. Geht man davon aus, daß Q_{total} ein Maß für die Expression des mGAT1 ist, bedeutet dies eine Regulation des mGAT1 in Expression und Funktion. Da der Strom stärker reduziert ist als die Expression, handelt es sich im Fall der Funktionsregulation um eine Hemmung des Stroms. Dies paßt mit den Ergebnissen von Osawa und Sato zusammen (Osawa I. et al., 1994; Sato K. et al., 1995); auch sie konnten eine reduzierte GAT1-Aktivität als Folge einer PKC-Aktivierung beschreiben.

Die Reduktion der Ratenbindungskonstante k_{bin} weist bei erhöhter PKC-Aktivität auf einen verlangsamten Na^+ -Bindungsprozeß hin. Der Prozeß der Na^+ -Dissoziation hingegen ändert sich nicht. Interessanterweise zeigt die Analyse der RateV-Kurven, daß mit der Na^+ -Bindung ein spannungsabhängiger Schritt reguliert wird, wohingegen die Hemmung des mGAT1-vermittelten Stroms spannungsunabhängig ist. Das läßt darauf schließen, daß die unter den gegebenen Versuchsbedingungen meßbaren Raten nicht den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Transportzyklus in Gegenwart von GABA darstellen.

PKC-Inhibition

Die Resultate der PKC-Inhibierung mit Calphostin C sind weniger eindeutig. Zwar werden auch in diesem Fall der mGAT1-vermittelte Strom und die Maximalamplitude

der Ladungsverschiebung Q_{total} reduziert; jedoch handelt es sich nicht um eine kontinuierliche Inhibition. Q_{total} wird in den ersten 10 Minuten der Inkubationszeit reduziert, um dann wieder zuzunehmen. Der mGAT1-vermittelte Strom sinkt kontinuierlich mit einer Zeitkonstanten von 4 Minuten. Da Meßwerte in den ersten 6 Minuten fehlen, sollte man die Zeitkonstante der Inhibition des mGAT1-vermittelten Stroms besser als „kleiner als 4 Minuten“ betrachten. Damit wäre es notwendig zu prüfen, ob sich der durch Calphostin C induzierte Effekt auswaschen läßt, um sicherzustellen, daß es sich bei den beobachteten Effekten nicht um direkte Calphostin C – mGAT1 – Interaktionen handelt. Dieses Experiment fehlt.

Die Diskrepanz in der Regulation zwischen mGAT1-vermitteltem Strom und Ladungsverschiebung, sowie die schnelle Reduktion des mGAT1-vermittelten Stroms deuten darauf hin, daß die soweit beschriebenen Effekte nicht einer Regulation durch Dephosphorylierung zugeschrieben werden können.

Allerdings ein Hinweis darauf, daß der mGAT1 tatsächlich durch Inhibition der PKC reguliert werden könnte, ist die zeitabhängige Änderung der RateV-Kurve. In den gemessenen 30 Minuten nimmt die Ratenbindungskonstante kontinuierlich ab, die Ratendissoziationskonstante nimmt kontinuierlich zu. Das kontinuierliche Fortschreiten eines Prozesses ist als Anzeichen für eine Regulation zu werten, die nicht allein auf mGAT1-Substrat-Wechselwirkung beruht.

PKA

Da der zeitliche Rahmen sowie die Verfügbarkeit experimentell einsetzbarer Oozyten (siehe Kapitel 2.1) begrenzt war, konnten Inkubationsexperimente bezüglich der PKA nicht erfolgreich durchgeführt werden.

Regulation durch Injektion

Zu Beginn der Experimente mit Enzyminjektion in die Oozyte stand die Frage ob sich ein injiziertes Enzym tatsächlich in der Oozyte verteilt oder an einem Punkt im Zytoplasma verbleibt. Drei Beobachtungen weisen darauf hin, daß sich das Enzym tatsächlich in der ganzen Zelle verteilt. Zum einen konnte gezeigt werden, daß Oozyten eine Art endogene „Pumpbewegung“ durchführen und so eine Durchmischung des Zytoplasmas verursachen (Richter P., persönliche Kommunikation). Zum anderen konnte beobachtet werden, daß in Oozyten von bestimmten Fröschen ca. 10 Minuten nach PP2B-Injektion spontane

Leitfähigkeitserhöhungen auftraten, die auf das Öffnen von Kanälen zurückzuführen sind (keine Abbildung). Des weiteren konnte durch die Injektion von GFP (Abbildung 5.2.5) gezeigt werden, daß sich ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 27kD innerhalb von ca 15-20 Minuten in der Oozyte verteilt. Zusammengenommen stellen diese vier Beobachtungen sicher, daß ein injiziertes Enzym sich nach ca. 20 Minuten über die ganze Zelle verteilt hat.

PP2B-injektion

Betrachtete man die durch PP2B-Injektion induzierte Reduktion des Q_{total} -Wertes der QV-Kurve als Reduktion der Expression, kann die in Abbildung 5.2.7 gezeigte Reduktion des mGAT1-vermittelten Stroms auf eine Expressionsregulation zurückgeführt werden. Die apparente GABA-Affinität ist jedoch in Abhängigkeit der Spannung erhöht. Das bedeutet, daß ein Teil des beobachteten Effekts auf eine funktionelle Regulation des mGAT1 zurückzuführen ist. Da der K_m -Wert für GABA in Abhängigkeit der Spannung zwischen 10 μM und 60 μM liegt kommt die durch erhöhte PP2B-Aktivität erhöhte GABA-Affinität des mGAT1 erst bei wesentlich niedrigeren GABA-Konzentrationen zum Tragen (in den meisten Experimenten wurden 400 μM GABA verwendet).

Die apparente Na^+ -Affinität für den mGAT1 ändert sich nicht bei erhöhter PP2B-Aktivität. Dafür wird der Maximalstrom in Abhängigkeit der Na^+ -Konzentration in Anwesenheit von PP2B spannungsabhängig reduziert (bezogen auf den durch Kurvenanpassung nach Hill berechneten I_{max} -Wert) (Abbildung 5.2.10). Das spiegelt sich allerdings nicht in den Ratenkonstanten wieder. Hier scheint die Na^+ -Bindung nach PP2B Injektion mit zunehmender Na^+ -Konzentration schneller zu werden.

Koinjektion von PKC und PP2B

Interessanterweise läßt sich die PP2B induzierte Reduktion der mGAT1-vermittelten Ströme bei 400 μM GABA durch die zusätzliche Injektion von PKC aufheben. In keinem Experiment dieser Versuchsreihe war eine Regulationen in QV-Kurve oder RateV-Kurve zu beobachten, auch nicht in solchen, in denen nur PP2B und Puffer koinjiziert wurde. Das ist nicht in Übereinstimmung mit den im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Experimenten. Allerdings spricht die klare Aufhebung des PP2B-induzierten Effekts bezüglich des mGAT1-vermittelten Stroms (Abbildung 5.2.13) für eine Regulation des mGAT1 durch Phosphorylierung und

Dephosphorylierung. Durch PKC-Injektion allein ließen sich keine Regulationen nachweisen.

Die Tatsache, daß sich der Effekt eines dephosphorylierenden Enzyms durch ein phosphorylierendes Enzym aufheben läßt, zeigt, daß der mGAT1 offensichtlich durch Phosphorylierung reguliert werden kann. Im Fall der Oozyten könnte die nicht nachweisbare Regulation durch PKC damit erklärt werden, daß bereits ein Maximum an GABA-Transportern phosphoryliert vorliegt.

Insgesamt bleibt festzuhalten, daß der mGAT1 in der Tat durch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen an Serinen oder Threoninen reguliert wird (Quick M. et al., 2004). In den hier durchgeführten Experimenten konnten zwar keine großen Effekte gemessen werden, aber es scheint, daß der mGAT1-vermittelte Strom durch PP2B reduziert und durch PKC aktiviert wird. Die kleinen gemessenen Effekte lassen sich mit einer kürzlich von Quick et al. veröffentlichte Arbeit erklären (Quick M. et al., 2004). In dieser Arbeit wird beschrieben, daß sich die Effekte von Tyrosinkinasen und Proteinkinasen gegenseitig ersetzen können; wird eins der beiden Enzyme inhibiert, wird das andere umso stärker aktiviert. Dieser Effekt minimiert funktionelle Auswirkungen durch Regulation einzelner phosphorylierender und dephosphorylierender Enzyme.

Um die in dieser Arbeit beobachteten Effekte stärker zur Geltung zu bringen, müßten die durchgeführten Experimente unter gleichzeitiger Inhibition der endogenen Tyrosinkinasen wiederholt werden. Dabei wäre in Bezug auf die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit insbesondere eine detaillierte Erforschung des Transporter-assoziierten Stroms und des Transportstroms hinsichtlich des Phosphorylierungsgrades des mGAT1 von Interesse.

6 Regulation durch humane mRNA

Regulation des mGAT1 durch Koinjektion von mGAT1-cRNA und humaner Hirn-mRNA in *Xenopus* Oozyten

6.1 Einleitung

Unter Epilepsie versteht man das wiederholte Auftreten von Anfällen unterschiedlichen Typs. Am bekanntesten ist wohl der generalisierte Grand Mal Anfall, der mit Schrei, Muskelzuckungen, Bewußtseintrübungen und Bewußtlosigkeit einhergeht. Die Ursache der Epilepsie ist weitgehend unbekannt. Die Möglichkeit einer genetischen Disposition besteht (Näheres: siehe Doktorarbeit Eckstein-Ludwig U., 1998).

Das Krankheitsbild ist allgemein zurückzuführen auf eine Übererregbarkeit bestimmter Areale des Gehirns, die auf einem Ungleichgewicht zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission beruht. Dabei kann das GABAerge System in seiner Funktion reduziert sein. Experimentelle Untersuchungen bestätigen diese Überlegung. Das Auftreten der GABAergen Synapse, sowie die Konzentration von Glutamindecarboxylase, GABA-Transaminase und GABA selbst kann in epileptischem Gewebe reduziert sein (Ribak C. et al., 1981 ; Schmidt D. et al., 1981 ; Lloyd K. et al., 1981; Ono T. et al., 1997). Auch die Expressionsregulation des GAT1 scheint das Geschehen der Epilepsie zu beeinflussen (During M. et al., 1995). Ein genetisch veränderter GAT1 konnte bis heute nicht kloniert werden. Über die funktionelle Regulation des GAT1 in Zusammenhang mit Epilepsie ist wenig bekannt. Problem bei der Untersuchung der funktionellen Regulation ist, daß bedingt durch die relativ geringe Expressionsrate und die langsame GABA Translokation elektrophysiologische Untersuchungen an primären Geweben bezüglich der GAT1 Funktion mit großen Fehlern behaftet sind.

Im Expressionssystem Oozyte ist es möglich durch Koinjektion verschiedener RNAs unterschiedliche Proteine zu exprimieren und so eine „epileptische Zelle“ in begrenztem Rahmen zu simulieren. Dieses System erlaubt es nach wie vor nicht,

einen genetisch veränderten GAT1 zu detektieren. Es bietet aber die Möglichkeit, Änderungen in der Regulation und der posttranslationalen Modifikation aufzudecken. Es konnte an *Xenopus* Oozyten gezeigt werden, daß durch Koinjektion von Poly(A)mRNA aus dem Hippocampus epileptischer Mäuse und der cRNA für den mGAT1 der mGAT1 hinsichtlich seiner Funktion und seines Expressionsgrades reguliert werden kann (Fueta Y. et al., 2003). Gegenüber koinjizierter Hirn-Poly(A)mRNA von Kontrollmäusen erhöhte die koinjizierte Hirn-Poly(A)mRNA epileptischer Mäuse den Expressionsgrad des mGAT1 und verstärkte die GABA-Aufnahme in Oozyten. Mit Hilfe dieser Ergebnisse ließe sich eine Übererregbarkeit bestimmter Hirnregionen in Mäusen erklären.

Um zu testen, ob die Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind, wurde Poly(A)mRNA aus Hirngewebe epileptischer Patienten zusammen mit dem mGAT1 in Oozyten exprimiert. Die Koinjektion ist notwendig, da die Hirn-RNA allein keine GABA-Transport-Aktivität zeigt. Als Kontroll-RNA wurde Poly(A)mRNA aus autoptischen Gewebeproben verunfallter, nicht epileptischer Patienten verwendet. An den Oozyten wurden TEVC Messungen und radioaktive ^3H -GABA Aufnahme Messungen durchgeführt.

6.2 Resultate

Zum besseren Verständnis des Texts wird in Tabelle 6.2.1 die Terminologie der verwendeten RNA kurz erklärt.

Tabelle 6.2.1

gebrauchte Terminologie	korrekte Benennung
<i>el-RNA</i>	<i>Poly(A)mRNA aus Hirngewebe epileptischer Patienten</i>
<i>control-RNA</i>	<i>Poly(A)mRNA aus Hirngewebe nicht epileptischer Patienten</i>

Die Tabelle definiert die in diesem Kapitel benutzte Terminologie bezüglich der unterschiedlichen verwendeten RNA's.

In den durchgeführten Experimenten wurden immer einfach injizierte Oozyten (nur mGAT1-RNA) mit doppelt injizierten Oozyten (mGAT1-RNA + el-RNA oder mGAT1-RNA + control-RNA) verglichen. Die Mengen der injizierten RNA richteten sich nach deren Konzentration und Regulationseffekt. Die Konzentration der mGAT1-RNA betrug immer 1 µg/µl, das injizierte Volumen immer 23 nl. Die Konzentration der Hirn-RNA schwankte zwischen 0,18µg/µl und 2,38 µg/µl. Da in ³H-GABA-Aufnahmemessungen keine konzentrationsabhängige Regulation des mGAT1 durch el-RNA festgestellt werden konnte (Tabelle 6.2.2), wurden in den folgenden Versuchen immer 46 nl Hirn-RNA, als Mittelweg zwischen maximaler RNA Menge und bestmöglicher Verträglichkeit für die Oozyten, koinjiziert.

Tabelle 6.2.2

	<i>nicht injiziert</i>	<i>mGAT1</i>	<i>mGAT1 + 4,6 el</i>	<i>mGAT1 + 13,8 el</i>	<i>mGAT1 + 23 el</i>	<i>mGAT1 + 46 el</i>	<i>mGAT1 + 64,4 el</i>
normierte GABA-Aufnahme ± SEM	0,031	1 ± 0,08	1,07 ± 0,09	0,97 ± 0,12	1,22 ± 0,11	1,21 ± 0,09	1,16 ± 0,13

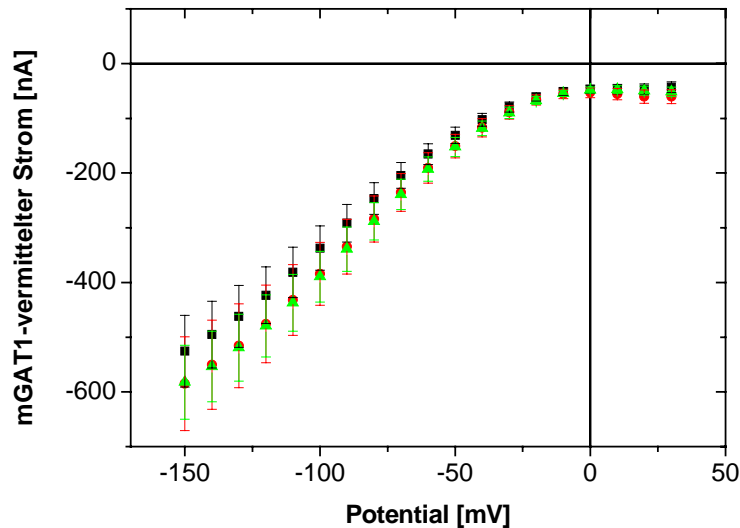
zeigt die normierte GABA-Aufnahmerate in Abhängigkeit der Menge injizierter el-RNA. Die Menge injizierter mGAT1-RNA betrug in allen Experimenten 23 nl. Das Volumen injizierter epileptischer RNA ist in [nl] dargestellt. Es handelt sich um Mittelwerte aus 20 Oozyten ± SEM.

Oozyten, die nur mit Hirn-RNA injiziert waren, zeigten keinen GABA-vermittelten Strom; d.h., es wurden weder funktionelle GABA-Rezeptoren noch GABA-Transporter in detektierbarer Konzentration exprimiert.

Oozyten, die hingegen mit frisch präparierte Maus-Hirn-RNA injiziert waren, zeigten eindeutig einen mit dem spezifischen GABA_A-Rezeptor Blocker Bicucullin blockierbaren Strom, was eindeutig auf die Expression von GABA-Rezeptoren hinweist (keine Abbildung).

In den IV-Kurven ist kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlich injizierten Oozyten vorhanden (Abbildung 6.2.1). Tendenziell scheint jedoch der mGAT1-vermittelte Strom der gesamten Oozyte in den koinjizierten Oozyten größer zu sein, unabhängig davon, ob el-RNA oder control-RNA koinjiziert wurde. Da alle verglichenen Ergebnisse von unterschiedlichen Einzeloozyten stammen, war eine sinnvolle Normierung nicht möglich.

Abbildung 6.2.1



Die Abbildung zeigt die IV-Kurven des mGAT1 in Gegenwart von 100 μM GABA. Es handelt sich um nicht normierte Mittelwerte von 16 – 34 Oozyten \pm SEM.

■	23 nl mGAT1-RNA	$n = 24$
●	23 nl mGAT1-RNA + 46 nl control-RNA	$n = 16$
▲	23 nl mGAT1-RNA + 46 nl el-RNA	$n = 34$

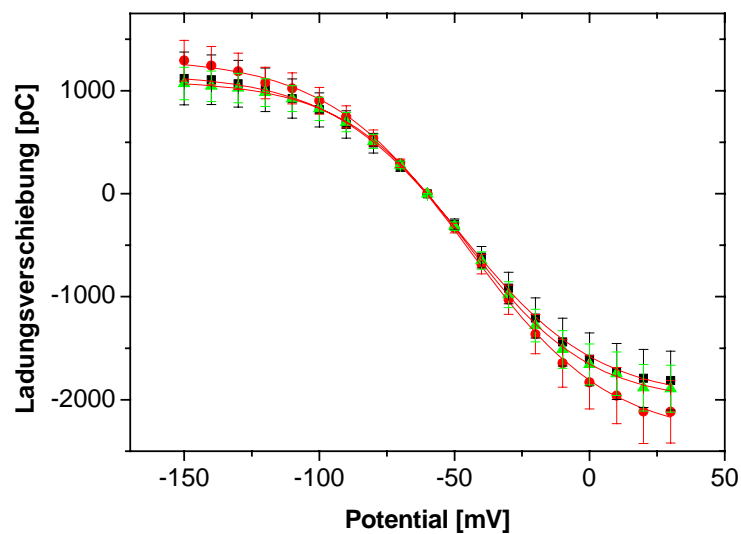
Die QV-Kurven der transienten Ströme zeigen keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 6.2.2). Allerdings ist nach einer Kurvenanpassung nach Fermi (Gleichung 2) aus den erhaltenen Parametern die Tendenz zu einer Expressionsregulation zu erkennen. Die mit el-RNA koinjizierten Oozyten zeigen im Vergleich zu den mit control-RNA injizierten Oozyten eine um 14% erniedrigte Maximalamplitude der Ladungsverschiebung Q_{total} . Da sich weder effektive Valenz z_F noch der $E_{1/2}$ -Wert ändern, handelt es sich wahrscheinlich um eine reduzierte Expression.

Die Analyse der Zeitkonstanten der transienten Ströme (keine Abbildung) zeigte keinen Unterschied zwischen den mit el-RNA und control-RNA koinjizierten Oozyten untereinander. Gegenüber den einfach injizierten Oozyten ist eine Reduktion der Zeitkonstante bei allen registrierten Potentialen um durchschnittlich 15 ms beobachtbar.

Der reduzierte Expressionsgrad scheint sich in der ^3H -GABA-Aufnahmerate widerzuspiegeln (Abbildung 6.2.3). Die ^3H -GABA-Aufnahme der mit el-RNA

koinjizierten Oozyten ist in derselben Größenordnung (17%) wie die Expressionsrate reduziert. Die Reduktion der Aufnahme rate ist signifikant ($p < 0,05$). Allerdings bleibt zu berücksichtigen, daß obwohl die einfach injizierten Oozyten sich in der QV-Kurve nicht von den el-RNA koinjizierten Oozyten unterscheiden, die ^3H -GABA-Aufnahme in den el-RNA koinjizierten Oozyten signifikant ($p < 0,05$) erhöht ist.

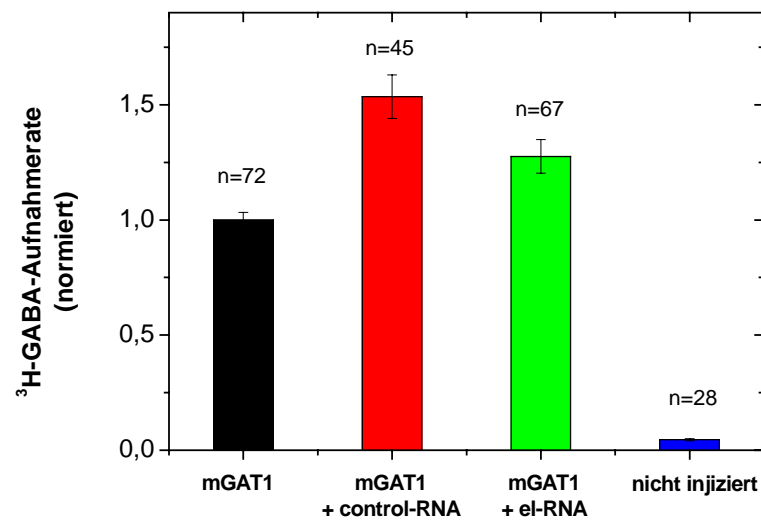
Abbildung 6.2.2



Die Abbildung stellt die nicht normierten QV-Kurven in Abwesenheit von GABA dar. Es handelt sich um Mittelwerte von 16 – 34 Oozyten \pm SEM. Die roten Linien sind Kurvenanpassungen nach Fermi (Gleichung 2). Die folgende Tabelle zeigt die durch die Anpassung erhaltenen Parameter.

		Q_{total} [fC]	z_F	$E_{1/2}$ [mV]
■ 23 nl mGAT1-RNA	$n = 24$	3158	1	-46,9
● 23 nl mGAT1-RNA + 46 nl control-RNA	$n = 16$	3681	0,96	-45,1
▲ 23 nl mGAT1-RNA + 46 nl el-RNA	$n = 34$	3120	1,09	-46

Abbildung 6.2.3



Die Abbildung zeigt die normierte $^3\text{H-GABA}$ -Aufnahmerate. Dargestellt sind die normierten Mittelwerte von 28 – 72 Oozyten \pm SEM. Die Nummern über den Säulen geben sie Oozytenzahl an. Zur Normierung wurden die Aufnahmeraten jeder einzelnen Oozyte durch den Mittelwert der $^3\text{H-GABA}$ -Aufnahme in einfach injizierte Oozyten dividiert. Die Reduktion der Aufnahmerate der el-RNA-injizierten Oozyten gegenüber den control-RNA-injizierten Oozyten ist signifikant ($p < 0,05$)

6.3 Diskussion

Qualität der verwendeten RNA

Sowohl bei der el-RNA als auch bei der control-RNA handelte es sich um sogenannte gepoolte RNA mehrerer unterschiedlicher Patienten, die im Falle der el-RNA unterschiedlich vorbehandelt waren; d.h., es wurden RNA Mischungen unterschiedlicher genetischer Herkunft untersucht. Control-RNA war nur aus Autopsien frühestens 16 Stunden nach Eintritt des Todes zu entnehmen; d. h., vermutlich unterlag die gesamte control-RNA schon vor Anwendung einem Verdau durch RNasen. Ein weiteres großes Problem war, daß die verwendete RNA teilweise bis zu 5 Jahre alt war.

Ergebnisse

Vergleicht man die Meßergebnisse einfach injizierter Oozyten mit den Meßergebnissen koinjizierter Oozyten, unabhängig davon ob el-RNA oder control-RNA injiziert wurde, lassen sich folgende regulatorische Effekte erkennen: Durch Koinjektion humaner Hirn-mRNA wurde die Transportrate des mGAT1 signifikant gesteigert. Auch der mGAT1-vermittelte Strom wurde verstärkt; allerdings ist dieser Effekt nur als Tendenz einer Regulation zu betrachten, da keine signifikanten Effekte gezeigt werden konnten. Deutlich ist jedoch, daß die Aktivierung des mGAT1-vermittelten Stroms wesentlich weniger ausgeprägt ist als die Aktivierung des Transports. Dies gibt Anlaß darüber nachzudenken, inwieweit durch Koinjektion von humaner Hirn-mRNA die Bildung von Transport-Modus und Kanal-Modus des mGAT1 beeinflusst werden. Ob die beobachteten Regulationen spezifische Effekte einzelner Komponenten der humanen mRNA waren, kann nicht gesagt werden.

Vergleicht man die Meßergebnisse der koinjizierten Oozyten untereinander, ist auch hier eine, wenn auch kleinere, Regulation zu sehen. Im Fall der el-RNA-koinjizierten Oozyten ist eine Reduktion sowohl in ^3H -GABA-Aufnahmerate als auch in der Maximalamplitude der Ladungsverschiebung Q_{total} zu beobachten. Der mGAT1-vermittelte Strom bleibt unbeeinflusst. Auf den ersten Blick scheint die Reduktion von Expression und GABA-Transport der erwarteten Regulation durch el-RNA zu widersprechen (Im Gegensatz zu Fueta Y. et al., 2003). Man sollte jedoch beachten, daß die el-RNA in zweierlei Hinsicht in Bezug zur Epilepsie stehen kann. Zum einen kann sie eine Komponente enthalten, die eine durch die Epilepsie verursachte negative Rückkopplungs-Regulation des mGAT1 darstellt, zum andern kann sie eine Komponente enthalten, die eine die Epilepsie verursachende Regulation des mGAT1 bewirkt.

Ist die el-RNA-abhängige Regulation Ursache der Epilepsie, lassen sich die beobachteten Effekte folgendermaßen erklären: Es ist bekannt, daß der GAT1 im sogenannten „reversed mode“ arbeitet, d.h. GABA von Zytoplasma in den extrazellulären Raum transportiert (Hilgemann D. et al. 1999). Dieser umgekehrte Transportmodus wird bisweilen für die physiologische Ausschüttung von GABA in den synaptischen Spalt mitverantwortlich gemacht (During M. et al., 1995; Barakat L. et al., 2002). In diesem Fall würde eine hier beschriebene Reduktion des mGAT1 die Ursache einer Epilepsie erklären können. Um diese Erklärung zu akzeptieren, bedarf es allerdings noch weiterer Nachweise, daß der mGAT1 tatsächlich

physiologischerweise an der Ausschüttung von GABA in den synaptischen Spalt beteiligt ist.

Ist hingegen die el-RNA bedingte Regulation des mGAT1 die Folge einer Epilepsie, lassen sich die beobachteten Effekte folgendermaßen erklären: Unter der Annahme, daß der mGAT1 ausschließlich für den Abtransport von GABA aus dem synaptischen Spalt verantwortlich ist, sollte eine reduzierte Expression bzw. Funktion des mGAT1 das inhibitorische Signal der Synapse verlängern und damit die Übererregbarkeit der Epilepsie ausgleichen.

Schlußfolgerung

Die aus den Experimenten mit epileptischen Mäusen gewonnen Ergebnisse sind nicht auf die hier durchgeführten Experimente mit humaner mRNA übertragbar. Obwohl die hier erhaltenen Ergebnisse erklärbar sind, bleiben sie aufgrund der beschriebenen Probleme mit der humanen RNA spekulativ. Auch die Tatsache, daß man nicht weiß, ob eine Änderung des GABAergen Systems Ursache oder Folge der Epilepsie ist, macht die Diskussion der Ergebnisse zur Spekulation.

Unabdingbar für Experimente dieser Art sind zukünftig eine konstante, reproduzierbare RNA Quelle, sowohl für el-RNA als auch für control-RNA. Die RNA muß in Mengen zur Verfügung gestellt werden, daß sie präparativ fraktioniert werden kann. Für jede sinnvolle Besprechung von Meßergebnissen wäre es absolut notwendig zu wissen, welche Bestandteile möglicher epileptisch veränderter RNA Folge der Epilepsie und welche Ursache der Epilepsie sind.

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßte sich mit der Untersuchung der Funktion und der Regulation des neuronalen GABA-Transporter 1 der Maus (mGAT1). Der mGAT1 ist ein elektrogener Neurotransmittertransporter, der in Gegenwart von GABA in Abhängigkeit des Membranpotentials und des Na^+ -Konzentrationsgradienten über der Membran einen sogenannten mGAT1-vermittelten Strom generiert.

Der mGAT1 wurde in Oozyten von *Xenopus laevis* exprimiert und mit elektrophysiologischen Methoden (Two-Electrode Voltage Clamp), mit radioaktiven Aufnahmemessungen (^3H -GABA, $^{22}\text{Na}^+$, $^{36}\text{Cl}^-$) und mit biochemischen Methoden untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte unter Verwendung des Tiagabin –Analogons SKF-89976-A gezeigt werden, daß der mGAT1-vermittelte Strom aus zwei Komponenten besteht, einem Transportstrom und einem Transporter-assoziierten Strom. Dabei wurde die hier gewonnene neue Erkenntnis genutzt, daß SKF-89976-A die Transporter-assoziierte Stromkomponente selektiv blockieren kann. Als Ursache des Transportstroms konnte die in der Literatur angenommene Transportstöchiometrie von $1\text{GABA} : 2\text{Na}^+ : 1\text{Cl}^-$ bewiesen werden. Als Ursache des Transporter-assoziierten Stroms konnte eine vom GABA-Transport entkoppelte Na^+ -spezifische Leitfähigkeit in Gegenwart von GABA identifiziert werden, die drei bis fünfmal größer ist als die Transport-Leitfähigkeit selbst. Transportstrom und Transporter-assoziiierter Strom scheinen von zwei unterschiedlichen Konformeren des mGAT1 vermittelt zu werden, die nicht miteinander im Gleichgewicht stehen.

In Abwesenheit von GABA ist in der Stromantwort auf einen Spannungspuls ein mit der Zeit abfallender transienter Strom zu beobachten. Hinsichtlich dieses langsamen transienten Stroms des mGAT1 konnte ein Bindungsmodell für Na^+ und Cl^- in Abwesenheit von GABA entwickelt werden. Nach diesem Modell kommt es vor der Bindung von GABA am Transporter zu einer sequentiellen Bindung zweier Na^+ -Ionen und eines Cl^- -Ion.

Regulation des mGAT1 konnte durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung des mGAT1 mittels PKC und PP2B gezeigt werden. Dabei scheint der mGAT1-vermittelte Strom durch Serin- / Threonin-Phosphorylierung verstärkt zu werden.

Durch Koinjektion von mGAT1-cRNA und humaner Hirn-mRNA konnte der mGAT1 zusammen mit unbekannten zytosolischen bzw. Membranproteinen des humanen

Hirns koexprimiert werden. Dabei wird die Transportrate des mGAT1 signifikant gesteigert; der mGAT1-vermittelte Strom wird nicht signifikant beeinflusst. Es scheint, daß eines oder mehrere der koexprimierten humanen Proteine die Bildung des Transport-Modus bzw. die Bildung des Kanal-Modus mit beeinflussen.

8 Anhang

8.1 Darstellungen

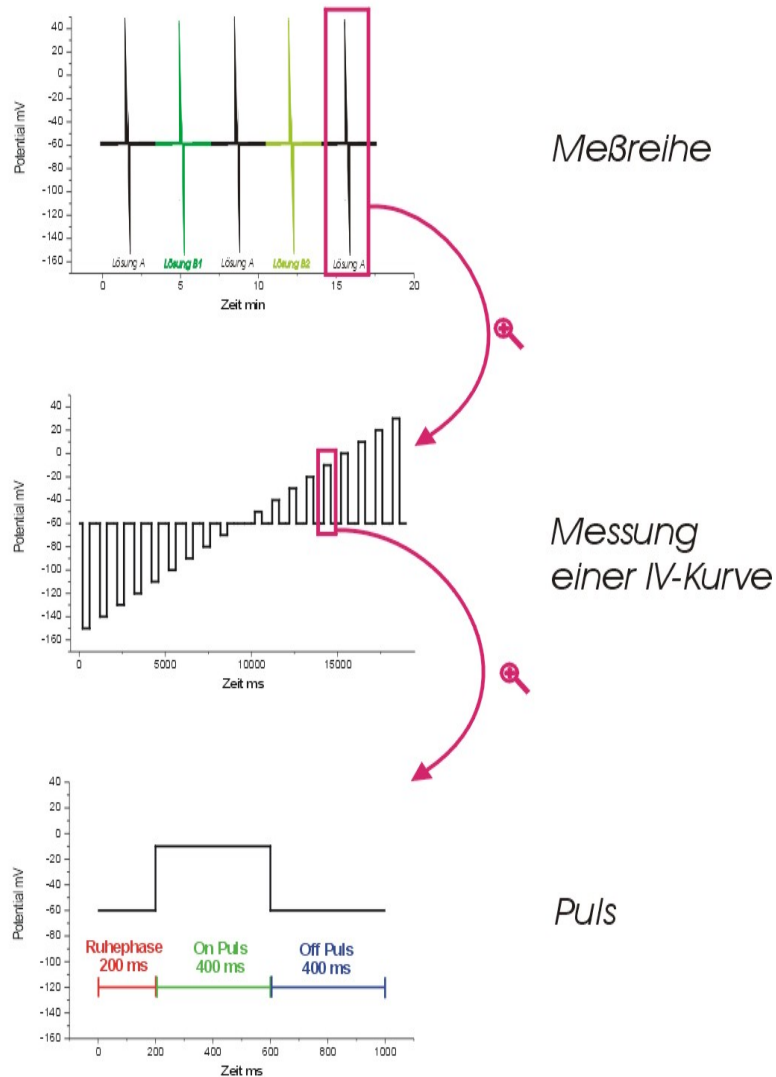
8.1.1 Der Spannungspuls

Um die elektrischen Eigenschaften des mGAT1 zu messen, wurden die zu untersuchenden Oozyten auf verschiedene Potentiale geklemmt. Die Klemmspannung richtete sich nach der Stabilität einer normalen Oozyte. Diese ist problemlos und reproduzierbar im Bereich von -150 mV bis $+30\text{ mV}$ bis zu einer Sekunde klemmbar. Die unterschiedlichen Potentiale, auf die die Oozyte in einem typischen Experiment geklemmt wurde, stellten rechteckige Pulse mit einer Länge von einer Sekunde dar. Dabei wurden die Pulse, ausgehend von einem Haltepotential von -60 mV , in 10 mV Schritten von -150 mV bis $+30\text{ mV}$ appliziert. Jeder Puls besteht aus einer Ruhephase, einem On-Puls und einem Off-Puls (Abbildung 8.1.1). Die Dauer des On-Pulses beträgt 400 ms .

8.1.2 Die Stromantwort

Damit über die Zellmembran die vorgegebene Spannung abfällt, fließt abhängig von der Spannungsvorgabe ein Strom. Im speziellen Fall der Oozyte und des verwendeten Pulsprotokolls, kann man den Strom in drei Komponenten aufgliedern, den Steady-State-Strom, den transienten Strom und den kapazitiven Strom (Abbildung 8.1.2 / Abbildung 8.1.3).

Abbildung 8.1.1



Eine Meßreihe bestand aus mehreren Messungen an einer Oocyte. Das Haltepotential betrug immer -60mV . Eine Messung bestand aus 19 Pulsen. Pro Messung wurde nur eine Lösung verwendet. Ein Puls bestand aus einer Ruhephase einem On-Puls und einem Off-Puls. Die Dauer der Ruhephase betrug 200 ms; die Dauer des On-Pulses und die des Off-Pulses betrugen 400ms. Das Potential von Ruhephase und Off-Puls betrug -60 mV . Der On-Puls hatte je nach Spannungssprung ein Potential zwischen -150 mV und $+30\text{ mV}$.

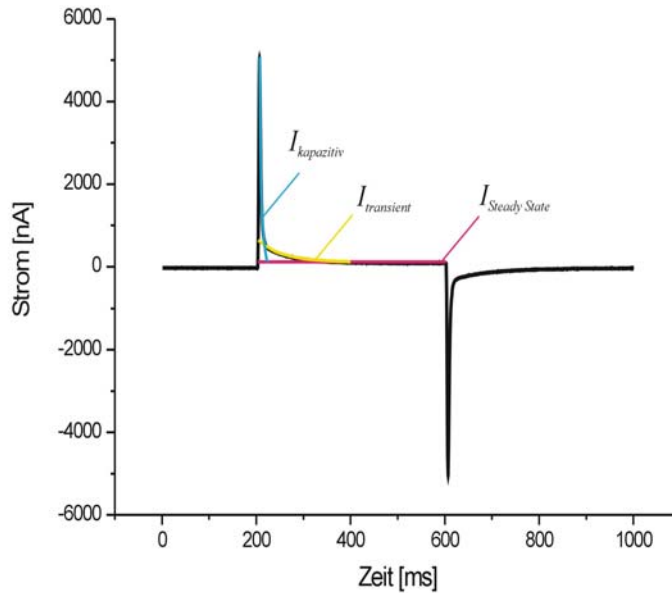
Messreihe = n Messungen

Messung = 19 Pulse

Puls = 200 ms Ruhephase
 + 400 ms On-Puls
 + 400 ms Off-Puls

Abbildung 8.1.2

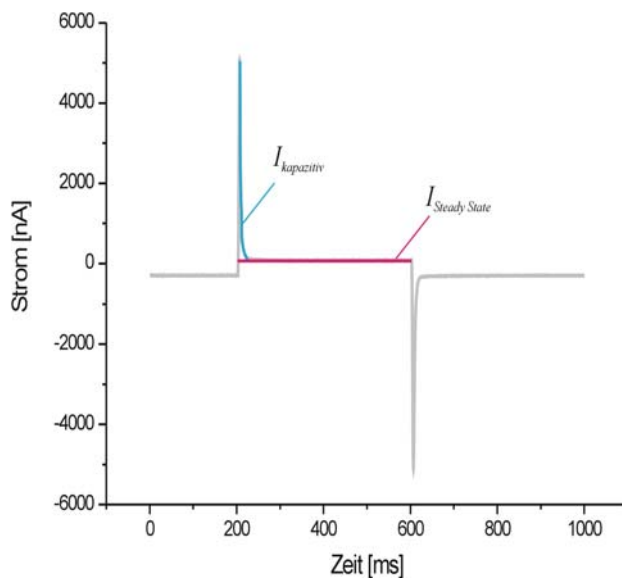
Stromantwort auf einen Spannungspuls in Abwesenheit von GABA



Die Graphik zeigt die Stromantwort auf einen Spannungspuls von -60 mV auf 0 mV in Abwesenheit von GABA. Deutlich zu erkennen ist, daß der Gesamtstrom eine Summe der drei Komponenten kapazitiven Strom, transienten Strom und Steady-State-Strom ist. Die genannten Ströme treten sowohl im On-Puls als auch im Off-Puls auf. Abhängig von den in On- und Off-Pulsen vorgegebenen Spannungen unterscheiden sie sich aber voneinander.

Abbildung 8.1.3

Stromantwort auf einen Spannungspuls in Gegenwart von GABA



Die Graphik zeigt die Stromantwort auf einen Spannungspuls von -60 mV auf 0 mV in Anwesenheit von GABA. Deutlich zu erkennen ist, daß der Gesamtstrom eine Summe der zwei Komponenten kapazitiven Strom und Steady-State-Strom ist. Der transiente Strom fehlt. $I_{\text{kapazitiv}}$ und $I_{\text{Steady State}}$ treten sowohl im On-Puls als auch im Off-Puls auf. Abhängig von den in On- und Off-Pulsen vorgegebenen Spannungen unterscheiden sie sich aber voneinander.

8.1.3 Der Steady-State-Strom

Der Steady-State-Strom ist der durch eine vorgegebene Spannung erzeugte stationäre Strom, der über die Oozytenmembran fließt. Er gehorcht nicht dem Ohmschen Gesetz: Der Widerstand hängt von der Konzentration des Substrats für den mGAT1, der Dichtigkeit der Oozytenmembran und den Eigenschaften der oozyteneigenen Membranproteine ab. Die Spannung ist vorgegeben. Ändern sich Spannung und Widerstand nicht, bleibt der Strom konstant.

Idealerweise sollten sich während einer Meßreihe die Dichtigkeit der Oozytenmembran und die Eigenschaften der oozyteneigenen Membranproteine nicht ändern. Oft kommt es aber während einer Meßreihe zu einem sogenannten „Run-Down“, das heißt, durch Veränderungen der Dichtigkeit der Oozytenmembran und Veränderungen der Eigenschaften der oozyteneigenen Membranproteine kann der elektrische Widerstand abnehmen. In der Folge nimmt der Strom mit der Zeit zu. Um trotzdem reproduzierbare Werte zu erhalten, werden vor und nach jeder Messung mit GABA je eine Messung ohne GABA durchgeführt. Der Mittelwert der Ergebnisse dieser beiden GABA-freien Messungen wird zur Differenzbildung mit dem Ergebnis der GABA-haltigen Messungen herangezogen (Abbildung 8.1.4). Diese Differenz wird als „mGAT1-vermittelter Strom“ bezeichnet.

Trägt man nun den mGAT1-vermittelten Strom in Abhängigkeit der angelegten Spannung in einen Graphen ein, erhält man die Strom-Spannungs-Kurve des mGAT1, die sogenannte IV-Kurve. Die Kurve zeigt die spannungsabhängige Aktivität des mGAT1 in Gegenwart von GABA an. Inwieweit sich diese Aktivität auf den Transport von GABA oder auf einen vom Transport entkoppelten Vorgang bezieht, läßt sich allein aus der IV Kurve nicht entnehmen (siehe Einleitung).

Abbildung 8.1.4

Berechnung des GABA-vermittelten Stroms / mGAT1-vermittelten Stroms

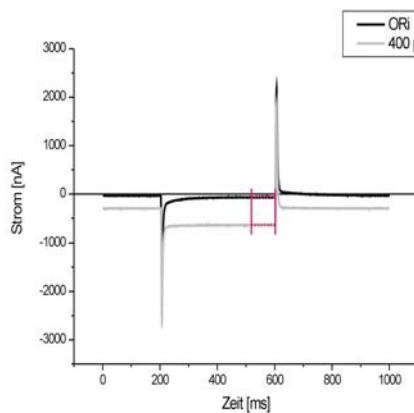


Abbildung A

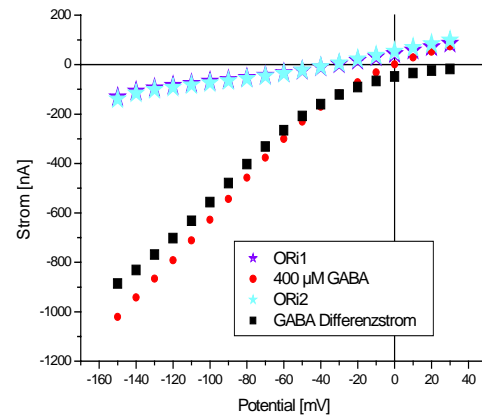


Abbildung B

Abbildung (A) zeigt eine Stromantwort auf einen Spannungspuls von -60 mV auf -100 mV. Die schwarze Linie zeigt den Strom in Abwesenheit von GABA. Es sind der kapazitive Strom, der transiente Strom und der Steady-State-Strom zu erkennen. Die graue Linie zeigt den Strom in Anwesenheit von GABA. Es sind der kapazitive Strom und der Steady-State-Strom zu erkennen. Der rot markierte Bereich stellt die letzten 20% der Stromantwort auf den On Puls dar.

Zur Berechnung des GABA-vermittelten Stroms (I_{GABA}):

Zur Berechnung des GABA-vermittelten Stroms werden in den letzten 20% der Stromantwort auf den On-Puls alle Meßwerte einer Messung gemittelt. In diesem Bereich sind der kapazitive Strom und der transiente Strom vernachlässigbar klein.

$I_{O_{zyte}}$ = ausschließlich durch endogene Membranproteine generierter Strom (in Abwesenheit von GABA)

I_{GABA} = GABA-vermittelter Strom (nur zu berechnen)

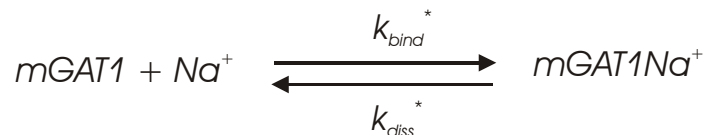
I_{gesamt} = durch mGAT1 und endogene Membranproteine generierter Strom (in Anwesenheit von GABA)

daraus folgt: $I_{GABA} = I_{gesamt} - I_{O_{zyte}}$

Abbildung (B) zeigt eine typische IV-Kurve. Sie ist zu erhalten nach Berechnung aller Differenzen gemäß Abbildung (A) der Steady-State-Ströme im On Puls zwischen -150 mV und $+30$ mV. Die schwarzen Quadrate zeigen den berechneten GABA-vermittelten Strom (I_{GABA}). Die Sterne zeigen den in Abwesenheit von GABA ausschließlich durch endogene Membranproteine generierten Strom $I_{O_{zyte}}$. Die roten Kreise zeigen den in Anwesenheit von GABA durch endogene Membranproteine und den mGAT1 generierten Strom I_{gesamt} .

8.1.4 Der transiente Strom

Der transiente Strom des mGAT1 ist ein durch einen Spannungspuls hervorgerufener, mit der Zeit abfallender Strom (siehe Abbildung 8.1.5). Er lädt den mGAT1 in seiner Eigenschaft als Kondensator auf. Als Ursache dieses transienten Stroms wird die Na^+ -Bindung an den mGAT1 angenommen. Ein bis heute akzeptiertes vereinfachtes kinetisches Modell beschreibt diese Bindung folgendermaßen:



Dieses kinetische Modell enthält Informationen über Quantität der Na^+ -Bindung und über die Geschwindigkeit eines an die Na^+ -Bindung gekoppelten Schritts. Die Quantität läßt sich mittels der Menge der verschobenen Ladungen in der Ladungs-Spannungs-Kurve des mGAT1 (QV-Kurve) darstellen und analysieren. Besonders wichtig ist dabei die Möglichkeit, über die Maximalamplitude Q_{total} der QV-Kurve die Zahl der Transporter in der Zellmembran messen zu können (siehe Gleichung 2a, Kapitel 8.2) Die Geschwindigkeit läßt sich mittels der Reaktionsraten k_{bind}^* und k_{diss}^* in der Zeitkonstante-Spannungs-Kurve des mGAT1 (τ V-Kurve) bzw. in der Rate-Spannungs-Kurve des mGAT1 (RateV-Kurve) darstellen und analysieren.

In der QV-Kurve wird die Ladungsmenge, die während eines transienten Stroms im mGAT1 verschoben wird, in Abhängigkeit von der angelegten Spannung aufgetragen. Die Ladungsmengen der transienten Ströme sind im On-Puls und im Off-Puls identisch. Da die transienten Ströme der Off-Pulse immer durch einen Spannungssprung auf -60 mV generiert wurden, ist im Gegensatz zu den transienten Strömen der On-Pulse, die durch Spannungssprünge auf unterschiedliche Potentiale generiert wurden, eine geringere Meßgenauigkeit zu erwarten. Das liegt daran, daß bei der Berechnung der verschobenen Ladung immer der stationäre Strom subtrahiert wird. Dieser ist im Gegensatz zu den On-Pulsen in allen Off-Pulsen identisch. Darum wurden in der vorliegenden Arbeit alle QV-Kurven durch die Analyse der transienten Ströme der Off-Pulse ermittelt.

In Abwesenheit von GABA sind der transiente Strom des mGAT1, der endogene Steady-State-Strom der Oozyte und der kapazitive Strom der Oozyte zu beobachten. In Anwesenheit von GABA ist der kapazitive Strom der Oozyte, der endogene Steady-State-Strom der Oozyte und der mGAT1-vermittelte Strom zu beobachten.

Abbildung 8.1.5

Zur Berechnung der verschobenen Ladung im Off-Puls

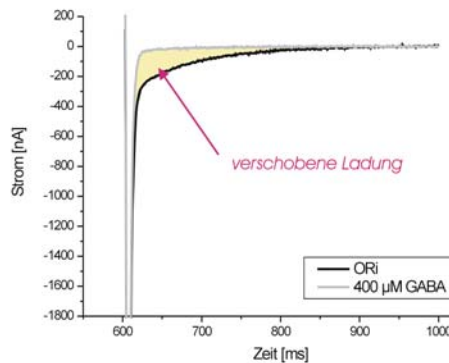


Abbildung A

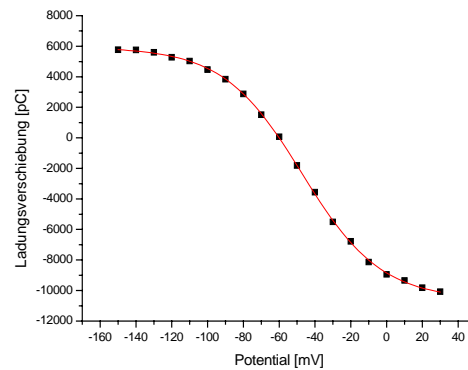


Abbildung B

Abbildung (A) zeigt eine Stromantwort auf einen Off-Puls von 0 mV auf -60 mV. Die schwarze Linie zeigt den Strom in Abwesenheit von GABA. Es sind der kapazitive Strom, der transiente Strom und der Steady-State-Strom zu erkennen. Die graue Linie zeigt den Strom in Anwesenheit von GABA. Es sind der kapazitive Strom und der Steady-State-Strom zu erkennen. Um die verschobene Ladungsmenge zu verdeutlichen, sind beide Strom-Zeit-Kurven vertikal so verschoben, daß der jeweilige Steady-State-Strom bei 0 nA liegt. Die verschobene Ladungsmenge ist die gelb dargestellte Fläche zwischen den beiden Kurven.

Zur Berechnung der verschobenen Ladungsmenge ($Q_{\text{transient}}$)

$$I_{\text{kapazitiv+transient}} = \text{Strom in Abwesenheit von GABA}$$

$$I_{\text{kapazitiv}} = \text{Strom in Anwesenheit von GABA}$$

$$Q_{\text{transient}} = \int I_{\text{kapazitiv+transient}} - \int I_{\text{kapazitiv}}$$

Abbildung (B) zeigt eine typische QV-Kurve. Sie ergibt sich aus allen verschobenen Ladungsmengen aller transienten Ströme der Off-Pulse zwischen -150 mV und +30 mV. Die schwarzen Quadrate sind die gemessenen Werte, die rote Linie ist die Anpassung nach der Fermi-Gleichung (Gleichung 2). Die Fermi-Gleichung beschreibt die Verschiebung von Ladungen im elektrischen Feld. Die Maximalamplitude (Q_{total}) der QV-Kurve wird beschrieben durch: $Q_{\text{total}} = Q_{\text{max}} - Q_{\text{min}}$. Q_{total} kann als Maß für die Anzahl der in der Zellmembran exprimierten Transporter gewertet werden. $E_{1/2}$ stellt ein Maß für die Na^+ -Affinität an den mGAT1 dar. Die effektive Valenz z_F ist der Produkt der im elektrischen Feld im einzelnen Transporter bewegten Ladung multipliziert mit dem Anteil des durchlaufenen Feldes.

Die endogenen Steady-State-Ströme und der mGAT1-vermittelte Strom sind zu subtrahieren. Um nun die Ladungsmenge, die einen transienten Strom am mGAT1 im Off-Puls hervorruft, zu erhalten, sind zunächst die Integrale dieser beiden Kurven zu berechnen. Die Differenz dieser Integrale ist die Menge verschobener Ladungen im

mGAT1. Die für jede Spannung berechnete Ladungsmenge wird als QV-Kurve dargestellt (Abbildung 8.1.5).

Da die QV-Kurve eine spannungsabhängige Ladungsverteilung zwischen zwei Zuständen im elektrischen Feld anzeigt, läßt sich zur genauen Analyse an die gemessenen Werte eine Fermi-Gleichung anpassen (Gleichung 2). Die Parameter der Gleichung zeigen die relative Zahl der Transporter (Q_{total}), die Na^+ -Affinität zum mGAT1 ($E_{1/2}$) und die effektive Valenz (z_F) der verschobenen Ladung an.

Abbildung 8.1.6

Zur Berechnung der Zeitkonstante des transienten Stroms im On Puls

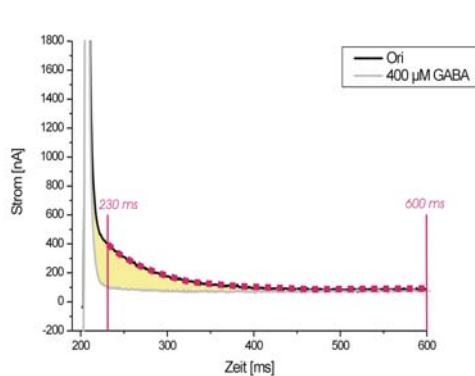


Abbildung A

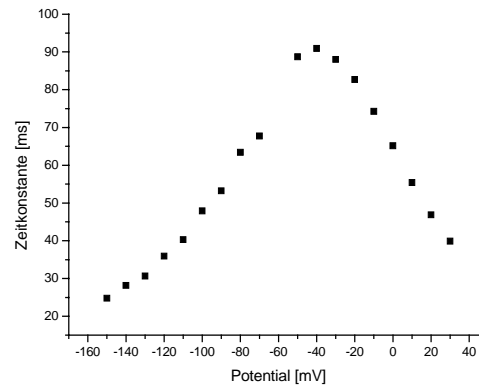


Abbildung B

Abbildung (A) zeigt eine Stromantwort auf einen On Puls von -60 mV auf 0 mV . Die schwarze Linie zeigt den Strom in Abwesenheit von GABA. Es sind der kapazitive Strom, der transiente Strom und der Steady State Strom zu beobachten. Die graue Linie zeigt den Strom in Anwesenheit von GABA. Es sind der kapazitive Strom und der Steady State Strom zu beobachten. Die rot gepunktete Linie zeigt die Anpassung an den transienten Strom nach Gleichung 7.

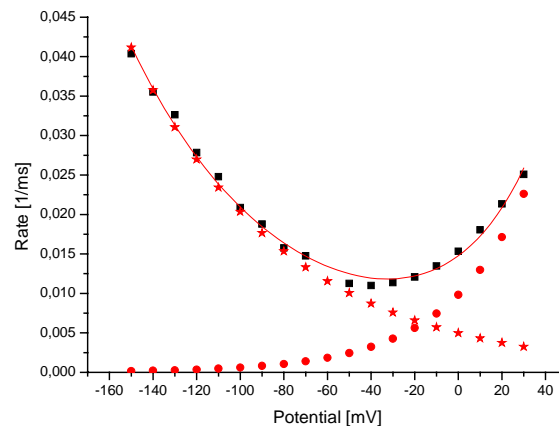
Abbildung (B) zeigt eine typische τV -Kurve. Sie ist zu erhalten nach Anpassung von Gleichung 7 an alle transienten Ströme der On Pulse zwischen -150 mV und $+30 \text{ mV}$.

In der τV -Kurve wird die Zeitkonstante, mit der ein transienter Strom am mGAT1 abfällt, in Abhängigkeit der angelegten Spannung aufgetragen (Abbildung 8.1.6). Die Zeitkonstante läßt sich durch eine Anpassung einer e-Funktion erster Ordnung (Gleichung 7) an die Strom-Zeit-Kurve im On-Puls in Abwesenheit von GABA erhalten. Um nicht eine Mischung der Zeitkonstanten aus kapazitivem Strom der Oozyte und transientem Strom des mGAT1 zu erhalten, wird die e-Funktion erst 30

ms nach Beginn des On-Pulses bis zum Ende des On-Pulses angepaßt. Da der kapazitive Strom einer Oozyte bei einer Filterung von 100 Hz schon nach 25 ms abgefallen ist, erhält man so die reine Zeitkonstante des transienten Stroms des mGAT1. Die Kurve zeigt die spannungsabhängige Zeitkonstante eines der Na^+ -Bindung assoziierten Prozesses am mGAT1 in Abwesenheit von GABA an. Dabei werden die Eigenschaften der Kurve bei Spannungen < -50 mV von der Na^+ -Bindung an den mGAT1 dominiert; bei Spannungen > -50 mV dominiert die Na^+ -Dissoziation vom Transporter (Abbildung 8.1.6).

In der RateV-Kurve (Abbildung 8.1.7) wird der Kehrwert der Zeitkonstanten des transienten Stroms in Abhängigkeit der angelegten Spannung aufgetragen. Im Vergleich zur τ V-Kurve handelt es sich nur um eine andere Art der Darstellung. Der Vorteil dieser Art der Darstellung liegt darin, daß die erhaltenen Informationen direkter ersichtlich werden. Beschreibt man den der Na^+ -Bindung assoziierten Prozeß am mGAT1 durch das oben vorgestellte Modell, läßt sich die Gesamtgeschwindigkeit des der Na^+ -Bindung assoziierten Prozesses als Summe der Bindung und Dissoziation darstellen. Gleichung 4 (siehe Kapitel 8.2) beschreibt diesen Prozeß. Dabei ist zu beachten, daß die effektiven Valenzen der Na^+ -Bindungsrate z_{bind} und die effektiven Valenzen der Na^+ -Dissoziationsrate z_{diss} sich von der effektiven Valenz der Fermi-Gleichung z_F unterscheiden.

Abbildung 8.1.7
Die RateV-Kurve



Typische RateV-Kurve

Die schwarzen Quadrate zeigen die Kehrwerte der gemessenen Zeitkonstante τ . Diese Kehrwerte stellen die Gesamtrate k_{ges} eines der Na^+ -Bindung assoziierten Prozesses dar.

Die rote durchgehende Linie ist eine Kurvenanpassung nach Gleichung 4. Da sich die meßbare Gesamtrate k_{ges} des der Na^+ -Bindung assoziierten Prozesses als Summe der spannungsabhängigen Raten k_{bind}^* und k_{diss}^* beschreiben läßt, kann man k_{ges} nach Gleichung 4 berechnet werden.

dabei werden folgende Parameter ermittelt:

k_{bind} = Ratenbindungskonstante eines der Na^+ -Bindung assoziierten Prozesses

k_{diss} = Ratendissoziationskonstante eines der Na^+ -Dissoziation assoziierten Prozesses

z_{bind} = Effektive Valenz der Na^+ -Bindungsrate

z_{diss} = Effektive Valenz der Na^+ -Dissoziationsrate

Die roten Sterne stellen die nach Kurvenanpassung berechnete spannungsabhängige Rate k_{bind}^* dar (repräsentiert Na^+ -Bindung). Die roten Punkte stellen die nach Kurvenanpassung berechnete spannungsabhängige Rate k_{diss}^* dar (repräsentiert Na^+ -Dissoziation).

8.1.5 Der kapazitive Strom

Der kapazitive Strom ist ein durch einen Spannungspuls hervorgerufener mit der Zeit abfallender Strom. Er lädt die Zellmembran in ihrer Eigenschaft als Kondensator auf. Der Strom fällt nach Aufladung der Zellmembran auf das Niveau des Steady-State-Stroms ab. An der Oozyte direkt ist die Membran nach zwei bis drei Millisekunden aufgeladen. Filtert man die Stromregistrierung bei 100 Hz, ist der gemessene Abfall des kapazitiven Stroms erst nach 25 Millisekunden auf dem Steady State Niveau angelangt. Der kapazitive Strom ist im On-Puls und im Off-Puls zu beobachten. An

mGAT1-exprimierenden Oozyten ist der kapazitive Strom nur in Gegenwart von GABA zu beobachten

8.2 Formelsammlung

Gleichung 1

$$V_M = V_C * \frac{R_M}{R_E + R_M}$$

Gleichung 1 beschreibt die Spannungsaufteilung durch Serienwiderstände. In diesem Fall sind R_M der Membranwiderstand, R_E der Elektrodenwiderstand, V_M das Membranpotential und V_C das Klemmpotential.

Gleichung 2

$$Q_{transient} = \frac{Q_{max} - Q_{min}}{1 + e^{\frac{(E - E_{1/2})z_F F}{RT}}} + Q_{min}$$

Gleichung 2 beschreibt mathematisch die Verteilung von Ladungen im elektrischen Feld. Es handelt sich um eine Beschreibung nach Fermi. Im Text wird ausschließlich von der „Fermi-Gleichung“ gesprochen.

Durch Kurvenanpassung werden die Parameter $E_{1/2}$, z_F und Q_{total} ($Q_{total} = Q_{max} - Q_{min}$) erhalten (zur genauen Bedeutung der Parameter siehe Abbildung 8.1.5). Dabei kann in der Verwendung in dieser Arbeit Q_{total} als ein Maß für die Zahl an Transporter in der Zellmembran angesehen werden. Die Zahl läßt sich nach folgender Gleichung berechnen:

Gleichung 2a

$$Q_{total} = z_F * e * N$$

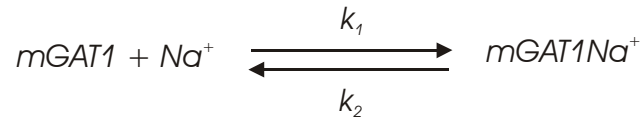
Dabei ist e = Elementarladung und N = Zahl der Transporter in der Zellmembran.

Gleichung 3

$$E_{1/2} = \frac{RT}{z_F} * \ln \left(\frac{[Na^+]^n}{K_m^n} \right)$$

Gleichung 3 beschreibt die Na^+ -Konzentrationsabhängigkeit des $E_{1/2}$ -Werte der Fermi-Gleichung.

Ursache des transienten Stroms am GAT1 ist die Bindung von Na^+ am GAT1. Dabei ist nicht klar, wie viele Na^+ -Ionen pro Transporter gebunden werden. Zur Vereinfachung ist im folgenden Reaktionsschema Na^+ nur einmal aufgeführt; es schließt aber ausdrücklich die Möglichkeit der Bindung eines zweiten Na^+ Ions mit ein.



Die Spannungs- und Na^+ -Abhängigkeit der im Reaktionsschema aufgeführten Reaktionsraten k_1 und k_2 lassen sich folgendermaßen beschreiben:

$$(a) \quad k_1 = k_1^* * [\text{Na}^+]^n * e^{-z_1 EF / RT}$$

$$(b) \quad k_2 = k_2^* * e^{+z_2 EF / RT}$$

Dabei sind k_1^* die Ratenbindungskonstante und k_2^* die Ratendissoziationskonstante. Der Exponent n zur Beschreibung der Na^+ -Konzentration ist notwendig, da ausdrücklich von der Möglichkeit einer mehrfachen Na^+ -Bindung ausgegangen wird. Die Wahrscheinlichkeit, daß der GAT1 den Zustand E_{GAT1Na^+} einnimmt läßt sich mit der Graphentheorie (King E., Altmann C., 1956 ; Kirchhoff G., 1847) folgendermaßen beschreiben:

$$(c) \quad E_{\text{GAT1Na}^+} = \frac{k_1}{k_1 + k_{-1}}$$

Durch Einsetzen der Gleichungen (a) und (b) erhält man folgenden Ausdruck:

$$(d) \quad E_{\text{GAT1Na}^+} = \frac{k_1^* * [\text{Na}^+]^n * e^{-z_1 EF / RT}}{k_1^* * [\text{Na}^+]^n * e^{-z_1 EF / RT} + k_{-1}^* * e^{+z_2 EF / RT}}$$

$$(d1) \quad E_{\text{GAT1Na}^+} = \frac{1}{1 + \frac{k_{-1}^* * e^{+z_2 EF / RT}}{k_1^* * [\text{Na}^+]^n * e^{-z_1 EF / RT}}}$$

Der Quotient $\frac{k_{-1}^*}{k_1^*}$ lässt sich durch K_m^n ersetzen. Der Exponent n ist auch hier angebracht, da von der Möglichkeit einer mehrfachen Na^+ -Bindung ausgegangen wird (wie im Modell ausdrücklich erwähnt). Beim Zusammenfassen der beiden Boltzmann Faktoren lässt sich die Summe aus z_1 und z_2 durch ein gemeinsames z ersetzen. Durch Umformung erhält man Gleichung (e)

$$(e) \quad E_{\text{GATINa}^+} = \frac{1}{1 + e^{(zF/RT) \left(E - RT / zF \ln \frac{[\text{Na}^+]^n}{K_m^n} \right)}}$$

Gleichung (e) wird mit der Fermi-Gleichung (Gleichung 2) verglichen: Laut Definition ist die Wahrscheinlichkeit den Zustand E_{GATINa^+} anzunehmen dann 0,5, wenn $E = E_{1/2}$. Für $E = E_{1/2}$ nimmt die Fermi-Gleichung folgende Form an:

$$(f) \quad Q_{0,5} = \frac{1}{1 + 1}$$

Gleichsetzung der Ausdrücke aus Gleichung (5 und (6) liefert Gleichung 3.

Gleichung 4

$$k_{\text{ges}} = k_{\text{bind}}^* e^{(-z_{\text{bind}} EF/RT)} + k_{\text{diss}}^* e^{(z_{\text{diss}} EF/RT)}$$

Gleichung 4 beschreibt die Rate der Ladungsbewegung im elektrischen Feld k_{ges} , die durch die simultan ablaufenden Prozesse von Na^+ -Bindung und Na^+ -Dissoziation generiert wird. k_{ges} ist die Summe der Raten eines der Na^+ -Bindung assoziierten Prozesses k_{bind}^* und eines der Na^+ -Dissoziation assoziierten Prozesses k_{diss}^* .

$$k_{\text{bind}}^* = k_{\text{bind}} e^{(-z_{\text{bind}} EF/RT)}$$

$$k_{\text{diss}}^* = k_{\text{diss}} e^{(z_{\text{diss}} EF/RT)}$$

Gleichung 5

$$I = I_{\max} \frac{\frac{[GABA]}{K_m}}{1 + \frac{[GABA]}{K_m} + \frac{[Inhibitor]}{K_I}}$$

Gleichung 5 beschreibt die einfache kompetitive Inhibition (hier: der GABA-Transport durch den mGAT1)

Gleichung 6

$$I = I_{\max} \frac{\frac{[GABA]}{K_m}}{1 + \frac{[GABA]}{K_m}}$$

Enzym-Aktivierung nach Michaelis-Menten

Gleichung 7

$$y = y_0 + A1 * e^{\frac{-(x-x_0)}{\tau1}}$$

Abfallende e-Funktion erster Ordnung

Gleichung 8

$$I = I_{\max}^{transp} \frac{\frac{[GABA]}{K_m^{transp}}}{1 + \frac{[GABA]}{K_m^{transp}} + \frac{[SKF]}{K_I^{transp}}} + I_{\max}^{trans-ass} \frac{\frac{[GABA]}{K_m^{trans-ass}}}{1 + \frac{[GABA]}{K_m^{trans-ass}} + \frac{[SKF]}{K_I^{trans}}}$$

Gleichung 8 beschreibt die kompetitive Inhibition eines aus zwei voneinander unabhängigen Komponenten bestehenden Prozesses (hier: der mGAT1-vermittelte Strom)

Gleichung 9

$$I = I_{\max} * \frac{[GABA]^n}{K_m^n + [GABA]^n}$$

Enzym-Aktivierung nach Hill

8.3 Literaturverzeichnis

- Aragon C, Lopez-Corcuera B. (2003) Structure, function and regulation of glycine neurotransmitters. *Eur J Pharmacol.* 479, 249-262.
- Barakat L, Bordey A. (2002) GAT-1 and reversible GABA transport in Bergmann glia in slices. *J. Neurophysiol.* 88, 1407-1419.
- Beckman ML, Quick MW. (1998a) Neurotransmitter transporters: regulators of function and functional regulation. *J. Membr. Biol.* 164,1-10.
- Beckman M., Bernstein E., Quick M. (1998b) Protein kinase C regulates the interaction between a GABA transporter and syntaxin 1A. *J Neurosci.* 18(16):6103-6112.
- Bendahan A., Kanner B. (1993) Identification of domains of a cloned rat brain GABA transporter which are not required for its functional expression. *FEBS Lett.* 318(1):41-44.
- Bennett, E.R. and Kanner, B.I. (1997) The membrane topology of GAT-1, a (Na⁺ + Cl⁻)-coupled γ -aminobutyric Acid transporter from rat brain. *J. Biol. Chem.* 272(2), 1203-1210.
- Bennett E.R., Su H., Kanner B.I. (2000) Mutation of Arginine 44 of GAT-1, a (Na⁺+Cl⁻)-coupled γ -Aminobutyric Acid Transporter from Rat Brain, Impairs Net Flux but not Exchange *J. Biol. Chem.* 275, 34106-34113.
- Berg J., Tymoczko J., Stryer L. (2003) Biochemie, 5. Auflage, *Spektrum Wissenschaftlicher Verlag*
- Bicho A.I., (2004) Investigation of rapid charge movements of the neuronal GABA transporter GAT1. *Dissertation im Fachbereich Chemische Pharmazeutische Wissenschaften, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main*
- Bismuth Y., Kavanaugh M., Kanner B. (1997) Tyrosine 140 of the gamma-aminobutyric acid transporter GAT-1 plays a critical role in neurotransmitter recognition. *J. Biol. Chem.* 272, 16096-16102.
- Blakely, R. D., DeFelice, L.J. and Hartzell, H.C. (1994) Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. *J. Exp. Biol.* 196, 263-281.
- Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294, 1351-1362.
- Borden LA, Murali Dhar TG, Smith KE, Weinshank RL, Branchek TA, Gluchowski C. (1994) Tiagabine, SK&F 89976-A, CI-966, and NNC-711 are selective for the cloned GABA transporter GAT-1. *Eur J Pharmacol.* 269, 219-224.
- Bossi, E., Giovannardi, S., Binda, F., Forlani, G. and Peres, A. (2002) Role of anion-cation interactions on the pre-steady-state currents of the rat Na⁺-Cl⁻-dependent GABA cotransporter rGAT1. *J. Physiol.* 541, 343-350.
- Cammack, N.J., Rakhilin, S.V. and Schwartz, E.A. (1994) A GABA transporter operates asymmetrically and with variable stoichiometry. *Neuron* 13, 949-960.
- Cammack, N.J. and Schwartz, E.A. (1996) Channel behaviour in a γ -aminobutyrate transporter *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 723-727.
- Clark, J.A. (1997) Analysis of the transmembrane topology and membrane assembly of the GAT-1 γ -aminobutyric acid transporter *J. Biol. Chem.* 272(23), 14695-14704.

- Corey J., Davidson N., Lester H., Brecha N., Quick M. (1994) Protein kinase C modulates the activity of a cloned gamma-aminobutyric acid transporter expressed in *Xenopus* oocytes via regulated subcellular redistribution of the transporter. *J. Biol. Chem.* 269,14759-14767.
- Deken S., Beckman M., Boos L., Quick M. (2000) Transport rates of GABA transporters: regulation by the N-terminal domain and syntaxin 1A. *Nature* 3, 998-1003
- de Souza NJ, Dohadwalla AN, Reden J. (1983) Forskolin: a labdane diterpenoid with antihypertensive, positive inotropic, platelet aggregation inhibitory, and adenylate cyclase activating properties. *Med Res Rev.* 3, 201-219.
- During MJ, Ryder KM, Spencer DD. (1995) Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy. *Nature.* 376, 174-177.
- Eckstein-Ludwig, U. (1998) Beeinflussung des GABA Transporters mGAT1 durch Aktivierung der PKC mit Phorboläther und durch Antiepileptika oder Epileptika *Dissertation im Fachbereich Physik, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main*
- Eckstein-Ludwig, U., Fei, J. and Schwarz, W. (1999) Inhibition of uptake, steady-state currents, and transient charge movements generated by the neuronal GABA transporter by various anticonvulsant drugs. *British Journal of Pharmacology* 128, 92-102.
- Eckstein-Ludwig, U., Fueta Y., Fei, J. and Schwarz, W. (2000) The neuronal GABA transporter GAT1 as a target for action of antiepileptic drugs. *Control and Diseases of Sodium Dependent Transport Proteins and Ion Channels, Proceedings of the First International Conference held in Shizuoka, Japan, 24-28th August 1999, Elsevier*
- Eskandari S, Kreman M, Kavanaugh MP, Wright EM, Zampighi GA. (2000) Pentameric assembly of a neuronal glutamate transporter. *Proc Natl Acad Sci US A.* 97, 8641-8646.
- Fesce, R., Giovannardi, S., Binda, F., Bossi, E. and Peres, A. (2002) The relation between charge movement and transport-associated currents in the rat GABA cotransporter rGAT1. *J. Physiol.* 545, 739-750.
- Forlani G, Bossi E, Ghirardelli R, Giovannardi S, Binda F, Bonadiman L, Ielmini L, Peres A. (2001) Mutation K448E in the external loop 5 of rat GABA transporter rGAT1 induces pH sensitivity and alters substrate interactions. *J. Physiol.* 536, 479-494.
- Freitag A, Wessler I, Racke K. (1998) Phosphodiesterase inhibitors suppress alpha2-adrenoceptor-mediated 5-hydroxytryptamine release from tracheae of newborn rabbits. *Eur J Pharmacol.* 354, 67-71.
- Fueta Y, Vasilets LA, Takeda K, Kawamura M, Schwarz W. (2003) Down-regulation of GABA-transporter function by hippocampal translation products: its possible role in epilepsy. *Neuroscience.* 118, 371-378.
- Galli, A., DeFelice, L.J., Duke, B.-J., Moore, K.R. and Blakely, R.D. (1995) Sodium-dependent norepinephrine-induced currents in norepinephrine-transporter-transfected KEK-293 cells blocked by cocaine and antidepressants. *J. Exp. Biol.* 198, 2197-2212.
- Galli, A., Blakely, R.D. and DeFelice, L.J. (1996) Norepinephrine transporters have channel modes of conduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 8671-8676.
- Galli A, Petersen CI, deBlaquiere M, Blakely RD, DeFelice LJ. (1997) Drosophila serotonin transporters have voltage-dependent uptake coupled to a serotonin-gated ion channel. *J. Neurosci.* 17, 3401-11.

- Golovanevsky V, Kanner BI. (1999) The reactivity of the gamma-aminobutyric acid transporter GAT-1 toward sulfhydryl reagents is conformationally sensitive. Identification of a major target residue. *J. Biol. Chem.* 274, 23020-23026.
- Gomez J, Casado M, Gimenez C, Aragon C. (1991) Inhibition of high-affinity gamma-aminobutyric acid uptake in primary astrocyte cultures by phorbol esters and phospholipase C. *Biochem J.* 275, 435-439.
- Goncalves PP, Meireles SM, Vale MG. (1999) Regulation of the gamma-aminobutyric acid transporter activity by protein phosphatases in synaptic plasma membranes. *Neurosci. Res.* 33,41-47.
- Grewer, C., Grabsch, E. (2004) New inhibitors for the neuronal amino acid transporter ASCT2 reveal its Na⁺-dependent anion leak. *J. Physiol.* 557, 747-759.
- Guastella, J., Nelson, N., Nelson, H., Czyzyk, L., Keynan, S., Miedel, M.C., Davidson, N., Lester, H.A. and Kanner, B.I. (1990) Cloning and Expression of a Rat Brain GABA Transporter, *Science* 249, 1303-1306.
- Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G. (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature.* 233,177-182.
- Haystead TA, Sim AT, Carling D, Honnor RC, Tsukitani Y, Cohen P, Hardie DG. (1989) Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature.* 33, 78-81.
- Hilgemann, D. W. and Lu, C.-C. (1999) GAT1 (GABA:Na⁺:Cl⁻) cotransport function Database reconstruction with an alternating access model. *J. Gen. Physiol.* 114:459-475.
- Jauch, P. and Läuger, P. (1986) Electrogenic properties of the sodium-alanine cotransporter in pancreatic acinar cells: II. Comparison with transport models. *J. Membrane biol.* 94, 117-127.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. and Jessell, T.M. (1995) Essentials of Neural Science and Behaviour, Appleton & Lange.
- Kanner BI. (1978) Active transport of gamma-aminobutyric acid by membrane vesicles isolated from rat brain. *Biochemistry.* 17, 1207-1211.
- Kanner BI. (1983) Bioenergetics of neurotransmitter transport. *Biochim Biophys Acta.* 726, 293-316.
- Kanner BI, Bendahan A, Pantanowitz S, Su H. (1994) The number of amino acid residues in hydrophilic loops connecting transmembrane domains of the GABA transporter GAT-1 is critical for its function. *FEBS Lett.* 356, 191-194.
- Kanner BI. (2003) Transmembrane domain I of the gamma-aminobutyric acid transporter GAT-1 plays a crucial role in the transition between cation leak and transport modes. *J. Biol. Chem.* 278, 3705-37012.
- Kavanaugh, M. P., Arriza, J. L., North, R. A. and S. G. Amara. (1992) Electrogenic uptake of γ -aminobutyric acid by a cloned transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 267:22007-22009.
- Keshet, G.I., Bendahan, A., Su, H., Mager, S., Lester, H.A. and Kanner, B.I. (1995) Glutamate-101 is critical for the function of the sodium and chloride-coupled GABA transporter GAT-1. *FEBS Letters* 371, 39-42.
- Keynan S, Kanner BI. (1988) gamma-Aminobutyric acid transport in reconstituted preparations from rat brain: coupled sodium and chloride fluxes. *Biochemistry.* 27, 12-17.
- Kilty J., Lorang D., Amara S. (1991) Cloning and Expression of a Cocaine-Sensitive Rat Dopamine Transporter. *Science* 254, 578-579.

- King E.L., Altmann C. (1956) Schematic method of deriving the rate law for enzyme catalyzed reactions. *J. Phys. Chem.* 60, 1375-1378
- Kirchhoff G. (1847) Über die Auflösung von Gleichungen, auf welche man bei der Untersuchung der linearen Vertheilung galvanischer Ströme geführt wird. *Poggendorfs Ann. Phys. Chem.* 72, 497-478
- Kleinberger-Doron, N. and Kanner, B.I. (1994) Identification of Tryptophan residues critical for the function and targeting of the γ -aminobutyric acid transporter (subtype A). *J. Biol. Chem.* 269(4), 3063-3067.
- Kobayashi E, Nakano H, Morimoto M, Tamaoki T. (1989) Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun.* 159, 548-553.
- Law RM, Stafford A, Quick MW. (2000) Functional regulation of gamma-aminobutyric acid transporters by direct tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 275, 23986-23991.
- Liu, Q.-R., López-Corcuera, B., Mandiyan, S., Nelson, H. and Nelson, N. (1993) Molecular characterization of four pharmacologically distinct γ -aminobutyric acid transporters in mouse brain. *J. Biol. Chem.* 268, 2106-2112.
- Liu, Y., Eckstein-Ludwig, U., Fei, J. and Schwarz, W. (1998) Effect of mutation of glycosylation sites on the Na^+ dependence of steady-state and transient currents generated by the neuronal GABA transporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1415:246-254.
- Loo, D. D., Eskandari, S., Boorer, K. J., Sarkar, H. K. and Wright, E. M.. (2000) Role of Cl^- in electrogenic Na^+ -coupled cotransporters GAT1 and SGLT1. *J. Biol. Chem.* 275:37414-37422.
- Lloyd K.G., Munari C., Bossi L., Stoeffels C., Talairach J., Morselli P.L. (1981) Biochemical evidence for the alterations of GABA-mediated synaptic transmission in pathological brain tissue (stereo EEG or morphological definition) from epileptic patients. in Morselli et al., Neurotransmitters, Seizures and Epilepsy, Raven Press, New York: 23-33
- Lu, C. C., Kabakov, A., Markin, V. S., Mager, S., Frazier, G. A. and Hilgemann, D. W. (1995) Membrane transport mechanisms probed by capacitance measurements with megahertz voltage clamp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:11220-11224.
- Lu, C.-C. and Hilgemann, D. W. (1999a) GAT1 ($\text{GABA}:\text{Na}^+:\text{Cl}^-$) cotransport function Steady state studies in giant *Xenopus* oocyte membrane patches *J. Gen. Physiol.* 114, 429-444.
- Lu, C.-C. and Hilgemann, D. W. (1999b) GAT1 ($\text{GABA}:\text{Na}^+:\text{Cl}^-$) cotransport function Kinetic studies in giant *Xenopus* oocyte membrane patches *J. Gen. Physiol.* 114, 445-457.
- Mabjeesh N., Kanner B. (1992) Neither Amino nor Carboxyl Termini Are Required for Function of the Sodium- and Chloride-coupled γ -Aminobutyric Acid Transporter from Rat Brain. *J. Biol. Chem.* 267, 2563-2568.
- MacAulay, N., Bendahan, A., Loland, C.J., Zeuthen, T., Kanner, B.I. and Gether, U. (2001) Engineered Zn^{2+} switches in the rat γ -aminobutyric acid (GABA) transporter-1. *J. Biol. Chem.* 276(44), 40476-40485.
- Mager, S., Naeve, J., Quick, M., Labarca, C., Davidson, N. and H. A. Lester. (1993) Steady states, charge movements, and rates for a cloned GABA transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 10:177-88.
- Mager, S., Kleinberger-Doron, N., Keshet, G.I., Davidson, N. Kanner, B.I. and Lester, H.A. (1996) Ion Binding and Permeation at the GABA Transporter GAT1, *J. Neurosci.* 16(17), 5405-5414.

- Masson, J., Sagné, C., Hamon, M. and El Mestikawy, S. (1999) Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 51, 439-464.
- Nelson D., Cox M., (2000) Lehninger Principles of Biochemistry, third edition. *Worth Publishers*
- Nelson, H., Mandiyan, S. and Nelson, N. (1990) Cloning of the human brain GABA transporter. *FEBS Lett.* 269, 181-184.
- Nelson, N. (1998) The family of Na⁺/Cl⁻ neurotransmitter transporters. *J. Neurochem.* 71, 1785-1803.
- Ono T, Fueta Y, Janjua NA, Ohmori O, Ohno K, Murai Y, Mita T. (1997) Granule cell disinhibition in dentate gyrus of genetically seizure susceptible El mice. *Brain Res.* 745, 165-172.
- Osawa I, Saito N, Koga T, Tanaka C. (1994) Phorbol ester-induced inhibition of GABA uptake by synaptosomes and by *Xenopus* oocytes expressing GABA transporter (GAT1). *Neurosci. Res.* 19, 287-293.
- Pacholczyk, T., Blakely, R.D. and Amara, S.G. (1991) Expression cloning of an antidepressant-sensitive noradrenaline transporter. *Nature* 350, 350-353.
- Pantanowitz, S., Bendahan, A. and Kanner, B.I. (1993) Only one of the charged amino acids located in the transmembrane α -helices of the γ -aminobutyric acid transporter (subtype A) is essential for its activity. *J. Biol. Chem.* 268(5), 3222-3225.
- Quick MW, Corey JL, Davidson N, Lester HA. (1997) Second messengers, trafficking-related proteins, and amino acid residues that contribute to the functional regulation of the rat brain GABA transporter GAT1. *J. Neurosci.* 17, 2967-2979.
- Quick MW, Hu J, Wang D, Zhang HY. (2004) Regulation of a gamma-aminobutyric acid transporter by reciprocal tyrosine and serine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279, 15961-15967.
- Radian R, Kanner BI. (1983) Stoichiometry of sodium- and chloride-coupled gamma-aminobutyric acid transport by synaptic plasma membrane vesicles isolated from rat brain. *Biochemistry.* 22, 1236-1241.
- Radian R, Kanner BI. (1985) Reconstitution and purification of the sodium- and chloride-coupled gamma-aminobutyric acid transporter from rat brain. *J. Biol. Chem.* 260, 11859-11865.
- Radian R., Bendahan A., Kanner B. (1986) Purification and Identification of the Functional Sodium- and Chloride-coupled γ -Aminobutyric Acid Transporter Glycoprotein from Rat Brain. *J. Biol. Chem.* 261, 15437-15441.
- Ribak C.E., Harris A.B., Vaughn J.E., Roberts E. (1981) Immunocytochemical changes in cortical GABA neurons in a monkey model of epilepsy. in Morselli et al., Neurotransmitters, Seizures and Epilepsy, *Raven Press, New York*: 23-33
- Risso, S., DeFelice, L. J. and Blakely, R.D. (1996) Sodium-dependent GABA-induced currents in GAT1-transfected HeLa cells. *J. Physiol.* 490:691-702.
- Saitoh T, Dobkins KR. (1986) Protein kinase C in human brain and its inhibition by calmodulin. *Brain Res.* 379,196-199.
- Sato K, Betz H, Schloss P. (1995) The recombinant GABA transporter GAT1 is downregulated upon activation of protein kinase C. *FEBS Lett.* 375, 99-102.
- Schmalzing G, Gloor S, Omay H, Kroner S, Appelhans H, Schwarz W. (1991) Up-regulation of sodium pump activity in *Xenopus laevis* oocytes by expression of heterologous beta 1 subunits of the sodium pump. *Biochem J.* 279, 329-236.

- Schmid D., Löscher W. (1981) GABA concentrations in cerebrospinal fluid and plasma of patients with epileptic seizures. in Morselli et al., Neurotransmitters, Seizures and Epilepsy, *Raven Press, New York*: 23-33
- Schmid J., Scholze P., Kudlacek O., Freissmuth M., Singer E., Sitte H. (2001) Oligomerization of the Human Serotonine Transporter and of the GABA Transporter 1 Visualized by Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy in Living Cells. *J. Biol. Chem.* 276, 3805-3810.
- Scholze P., Freissmuth M., Sitte H. (2002) Mutations within an intramembrane leucine heptad repeat disrupt oligomer formation of the rat GABA transporter 1. *J. Biol. Chem.* 277, 43682-43690.
- Schwarz W., Rettinger J. (2004) Elektrophysiologie. *Shaker Verlag*.
- Sonders MS, Amara SG. (1996) Channels in transporters. *Curr Opin Neurobiol.* (3): 294-302.
- Sonders MS, Zhu SJ, Zahniser NR, Kavanaugh MP, Amara SG. (1997) Multiple ionic conductances of the human dopamine transporter: the actions of dopamine and psychostimulants. *J Neurosci.* (3):960-974.
- Stühmer W. (1998) Electrophysiologic recordings from *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol.* 293,280-300.
- Tam A., Guo L., Lam D. (1994) Cloning and Sequencing of mouse GABA transporter complementary DNA. *Cell Research* 4,109-116.
- Tamura S., Nelson H., Tamura A., Nelson N. (1995) Short External Loop as Potential Substrate Site of γ -Aminobutyric Acid Transporters. *J. Biol. Chem.* 270, 28712-28715.
- Vasilets L. (1997) Diversity of Regulatory Phosphorylation of the Na^+/K^+ -ATPase from Mammalian Kidneys and *Xenopus* Oocytes by Protein Kinases: Characterization of the Phosphorylation Site for Protein Kinase C. *Cell. Physiol. Biochem.* 7, 1-18
- Whitworth TL, Quick MW. (2001) Substrate-induced regulation of gamma-aminobutyric acid transporter trafficking requires tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276, 42932-42937.
- Yaumachi, A., Uchida, S., Kwon, H.M., Preston, A.S., Brooks Robey, R., Garcia-Perez, A., Burg, M.B. and Handler, J.S. (1992) Cloning of a Na^+ - and Cl^- -dependent betaine transporter that is regulated by hypertonicity. *J. Biol. Chem.* 267, 649-652.
- Yu, N., Cao, Y., Mager, S and Lester, H.A. (1998) Topological localization of cysteine 74 in the GABA transporter, GAT1, and its importance in ion binding and permeation, *FEBS Letters*, 426,174-178.
- Zahniser NR, Doolen S. (2001) Chronic and acute regulation of Na^+/Cl^- -dependent neurotransmitter transporters: drugs, substrates, presynaptic receptors, and signaling systems. *Pharmacol Ther.* 92, 21-55.
- Zhou Y, Bennett ER, Kanner BI. (2004) The aqueous accessibility in the external half of transmembrane domain I of the GABA transporter GAT-1 Is modulated by its ligands. *J. Biol. Chem.* 279, 13800-13808.
- Zhu H, Klemic JF, Chang S, Bertone P, Casamayor A, Klemic KG, Smith D, Gerstein M, Reed MA, Snyder M. (2000) Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat. Genet.* 26, 283-289.
- Zomot E, Kanner BI. (2003) The interaction of the gamma-aminobutyric acid transporter GAT-1 with the neurotransmitter is selectively impaired by sulfhydryl modification of a conformationally sensitive cysteine residue engineered into extracellular loop IV. *J. Biol. Chem.* 278, 42950-42958.

8.4 Lebenslauf

persönliche Daten:

Name: Stephan Michael Krause
Geburtsdatum / Ort: 24. März 1977 in Frankfurt am Main, Deutschland
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1983-1987	Lindenschule in Kriftel
1987-1989	Weingartenschule in Kriftel
1989-1996	Heinrich-von-Gagern-Gymnasium in Frankfurt am Main
1996	Abitur

Universitäre Ausbildung:

1996-2000	Pharmaziestudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
Oktober 2000	Zweites Staatsexamen
November 2000 bis April 2001	Pharmaziepraktikant in der Brunnenapotheke in Liederbach
Dezember 2001	Drittes Staatsexamen
seit Mai 2001	Doktorand am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main

Auslandsaufenthalte:

September 2002 bis Dezember 2002 Forschungsaufenthalt am
“Institute of Biochemistry and Cell Biology of the Chinese
Academy of Science” in Shanghai
Oktober 2003 bis Dezember 2003 Forschungsaufenthalt am
“Institute of Biochemistry and Cell Biology of the Chinese
Academy of Science” in Shanghai

Lehre:

Betreuung des Elektrophysiologiepraktikums für
Naturwissenschaftler der Johann Wolfgang Goethe-Universität in
Frankfurt am Main

Akademische Lehrer:

Prof. Dr. Dieter Steinhilber, Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz,
Prof. Dr. Hermann Linde, Prof. Dr. Christian Noe, Prof. Dr. Günter
Lambrecht, Prof. Dr. Walter Müller, Prof. Dr. Theo Dingermann,
Prof. Dr. Jörg Kreuter, Prof. Dr. Eberhard Ehlers, Prof. Dr.
Wolfgang Schwarz

8.5 Danksagung

Die Fertigstellung dieser Arbeit wäre ohne die Hilfe meiner Kollegen und Freunde und ohne die Unterstützung meiner Familie nicht möglich gewesen.

Mein ganz besonderer, aufrichtiger Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schwarz: Für die Möglichkeit in Ihrem Labor elektrophysiologisch arbeiten zu dürfen; für Ihre Geduld, immer wieder und jederzeit Erklärungen und Unterstützung zu geben; für den sehr guten Einstieg ins wissenschaftliche Arbeiten in fast familiärer Arbeitsatmosphäre. Ganz besonders möchte ich mich für die intensive Unterstützung in den letzten Wochen meiner Doktorarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Steinhilber möchte ich für die Bereitschaft danken, die Verpflichtungen und die Mehrarbeit als Erstgutachter so offen und unproblematisch zu übernehmen.

Vielen Dank an Frau Heike Biehl und Frau Heike Fotis, die mir in der gesamten Zeit meiner Arbeit tatkräftig zur Seite standen.

Sehr herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner ganzen Familie bedanken, ohne deren Zuneigung und Energie meine schulische und universitäre Ausbildung und diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.